原

著

顔面突起の癒合に関する光学顕微鏡および 電子顕微鏡による発生学的研究

小 坂 克 子

東京医科歯科大学歯学部歯学科顎口腔総合研究施設顎顔面発生機構研究部門
(指導：江藤一洋教授)

(1984年 6 月27日 受付)

The light and electron microscopic study of the fusion of facial prominences

Katsuko Kosaka

Section of Craniofacial Development and Anomalies Institute of Stomatognathic Science
Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Director : Prof. Kazuhiro Eto)

The contact sites between the medial and lateral nasal prominences during the period of primary palate formation of the mouse embryo were examined by light and electron microscope. Characteristic superficial cells were observed at the transitional regions between the surface ectoderms and the nasal epithelia at the end of the isthmus, where the initial contact of the opposing nasal prominences took place. At the later stage the contact sites extended to the bottom of the ravine formed by the two nasal prominences, where the superficial cells always seemed to bridge the area between the nasal prominences. These superficial cells had a large clear nucleus and abundant cytoplasm as well as the common structural features characteristic of the embryonic cells. These cells were also observed on the surface near the contact sites, that is the presumptive fusion area. At the contact sites as well as in the surrounding area, there were well developed junctional complexes (tight, intermediate and gap junctions and desmosomes) between the superficial cells. Many filamentous structures were observed subjacent to the plasma membrane of the superficial cells, some of which were associated with the junctional complexes, and also asymmetrical desmosomes were observed at the contact sites. These observations suggest that these superficial cells play a critical role in the contact of the medial and lateral nasal prominences throughout the fusion process.

緒 言

顔面形態は、内側鼻突起、外側鼻突起および上顎突起の3つの顔面突起より形成される。マウス胎仔では、胎齡 9.5 日(腔栓日を 0 日とする)に鼻板の形成がおこり、続いて鼻板の陥入が始まる。それに伴い鼻板の両側に内側鼻突起と外側鼻突起が隆起する。つぎに、この両鼻突起同士がその後

方端(口窩に近い部位)から癒合を開始する。癒合はファスナーを閉じるように連続して前方(眼窩に近い部位)へ進み(Zipping up)、それを上顎突起が側面から補強する形で、一次口蓋および鼻窩を含む下顔面が形成されるといわれている¹⁻³⁾。

内側鼻突起と外側鼻突起の癒合過程とは、まず両鼻突起同士が互いに接触(contact)し、その接触部分で上皮細胞は接着(adhesion)して、上皮

壁 (epithelial wall または nasal fin) を作る。さらにこの上皮壁の一部は細胞死 (cell death) により崩壊したのち、その部分は両鼻突起の顔面間葉組織によって置き換わり癒合は完了する¹⁻⁶⁾。

顔面突起の癒合にみられるような現象は、顔面形態形成に限らず、神経管、二次口蓋、心臓、眼などの器官の発生過程においてもおこり、このような器官の形成に重要な役割を果たしている。神経管や二次口蓋と同様に⁷⁻¹⁸⁾、顔面突起の癒合時にみられる上皮細胞の接着についても、接着時にみられる上皮表層の糖皮 (surface coat) や、表層上皮細胞の細胞膜が特殊化した細突起 (lamellapodia, ruffle 等) 同士の接触、それに続くより大きな細胞質突起の絡み合いなどが、接着においてまず第1におこる事象であり、これらが接着に関与すると考えられている^{4,19-23)}。ところが、これらの研究は、接着に関与する細胞表面の糖皮や膜の特殊化のみに注目し、直接に接着に関与し、その後はこの領域から消えてしまう細胞自身についてはほとんど記載していない。

そこで本研究では正常マウスを用いて、内側鼻突起と外側鼻突起の癒合がおこる胎齢 9, 10, 11 日について、各発生段階の癒合部の先端すなわち突起同士の接触部に注目して、光学および電子顕微鏡を用いて組織像の観察を行った。そして従来の研究では考慮されなかった発生が進むにつれておこる組織像の変化について注目した上で、直接接触に関与すると思われる細胞の特徴とその分布、さらに接触に伴いどのような細胞膜の特殊化 (membrane specialization) がおきているかを調べた。

材料および研究方法

本研究では ICR マウス (日本クレア) を用いた。交配時間は、夜 8 時から翌朝 8 時までとし、朝 8 時に腔栓を確認したものと、確定妊娠 ICR マウス (日本クレア) の 2 つのグループの妊娠マウスを用いた。ともに腔栓確認日の午前 2 時を妊娠 0 日 0 時刻 (D 0/0) とした。妊娠 9, 10, 11 日のさまざまな時刻に母獣を殺し胎仔の固定を行った。

たとえば、妊娠 10 日の午前 10 時の固定により得られた胎仔は胎齢 10 日 8 時間 (D 10/8) の胎仔とし (Trasler (1968)²⁾), また D 10/0~D 10/12 を胎齢 10 日, D 10/12~D 10/24 を胎齢 10 1/2 日とるように半日単位のグループ分けを行った。

エーテル麻酔下で子宮を母獣から採り出したのち、4℃の生理的食塩水 (phosphate buffered saline (PBS)) 中で胎仔を子宮から採り出した。まだ後肢芽 (hind limb bud) が発生していない早期の胎仔は、顔面における鼻板の出現および鼻板の陥入の有無により分類し、後肢芽発生後の胎仔は、尾体節数 (tail somite 数, 以後 T. S. と略す) すなわち後肢芽の尾側端から尾の先端までの体節数により 2 T. S. ずつ分類した。総数で 59 匹の妊娠マウスから 626 匹の胎仔を得たが、そのうち 47 匹の妊娠マウスから得た胎仔 583 匹は、同腹仔 (litter-mate) 間の T. S. の分布を調べ (図 1), 320 匹の胎仔については、T. S. 以外に顔の形態による分類を行った。Trasler (1968)²⁾ の分類に基づいて分類し、各項目の特徴については表 2 に注としてまとめている。

発生段階を確認した胎仔は、心臓の拍動 (生死) を確認したのち、頭部を切り離し、つぎのような固定を行った。光学顕微鏡および透過電子顕微鏡のための固定では、多くのものは glutaraldehyde (G) と paraformaldehyde (P) の混合液の濃度を上昇させながら、(I) から (IV) までの段階的固定を行った。(I) 1% G, 1% P, 0.025M Caco-dylate buffer (CB) pH 7.2~7.3 (以下 pH は同様) にて 1 時間から 1 晩, (II) 1% G, 1% P, 0.05M CB にて 1~2 時間, (III) 2.5% G, 2% P, 0.05M CB にて 1 時間, (IV) 5% G, 4% P, 0.05M CB にて 1 時間。また一部は (I) から (II), (I) から (III) で固定を打ち切った。固定後、0.05M CB で洗浄したのち、1% OsO₄, 0.05M CB で 1~1.5 時間後固定し、1.5~2% Uranyl acetate 溶液により 45~60 分ブロック染色した。その後、アルコール脱水し、Epon-Araldite の混合樹脂に包埋した。

LKB ミクロトームにて、ガラスナイフで fron-

tal 方向および coronal 方向(図 3 C 参照)に $1\mu\text{m}$ の切片を作製し, Toluidine Blue により染色し, frontal 方向の連続切片については 20 枚に 1 枚ごとに, 光学顕微鏡 (Zeiss Universal および Olympus Vanox) にて観察した。ダイヤモンドナイフにより, frontal 方向に薄切りした超薄切片は Uranyl acetate および Lead citrate による二重染色を行ったのち, 透過電子顕微鏡 (日本電子 100 CX) にて観察した。一部の試料においては, frontal 方向の $100\mu\text{m}$ または $150\mu\text{m}$ の連続切片を West の方法²⁴⁾ により作製し, 光学顕微鏡および微分干渉顕微鏡 (Nikon) にて観察後, 同様の樹脂に再包埋し, frontal 方向に垂直な方向の超薄切片を作製した。また走査電子顕微鏡用の試料は, (I) 1%G, 1%P, 0.05M CB にて 1 晩固定後, (II) 3%G, 0.05M CB にて 1~2 晩固定したものと, (I)(II) 後さらに 1%OsO₄, 0.05M CB にて 1~1.5 時間後固定したものの 2 種類について, アルコール脱水, 酢酸イソアミル置換, 臨界点乾燥後, 金蒸着し走査電子顕微鏡 (日立 S-800) にて観察した。

パラフィン包埋用の試料は, Bouin 固定液で 1 晩固定し, アルコール脱水後パラフィン包埋し, $7\mu\text{m}$ の連続切片を作製し 500 倍の光学顕微鏡写真から 3 次元的な再構築を行った。またステレオ実体顕微鏡写真には Bouin 固定後のものをを用い, Nikon SMZ により撮影した。

結 果

これまでの C57BL 系マウス, ICR 系マウスの

研究から, ともに胎齢 10 日から 11 日にかけて内側鼻突起と外側鼻突起の癒合が観察されると報告されているので^{2,20)}, 本研究では鼻突起の癒合をとらえるために, 鼻板形成の時期をも含めて, 胎齢 9, 10, 11 日の胎仔を対象とした。

胎齢 10, 11 日に固定した胎仔を胎齢により分け, 同腹仔ごとに T. S. の分布を示したのが図 1 である。交配時間に若干差のある 2 つのグループの妊娠マウスを用いたが, 胎齢による T. S. の分布に関して差がみられなかったので, 区別せずに以下の観察を行った。同腹仔内でもかけ離れて大きいもの, 小さいものを除いても一般に T. S. は 4~7 のばらつきがあり, また同じ胎齢でも得られた胎仔の T. S. の分布範囲は広く, T. S. が 10~15 差のあるものもあった。また胎齢を時間単位で取り T. S. を比較すると, T. S. の大小に前後するものがみられた。一方半日単位でまとめると, 半日ごとのグループ内の T. S. の分布範囲は 10~15 と広いが, 半日単位での T. S. の増加の傾向は明らかであった (表 1)。また鼻板の陥入から内外両鼻突起の癒合という顔面の形態変化は, T. S. の増加と並行することがわかった (表 2)。以上のことから, 本研究では胎齢ではなく T. S. を基本にグループ分けして観察を行った。

1. 実体顕微鏡による観察

成長していく胎仔の顔面の記載にあたり, 本研究では図 2, 3 に示すような方向に胎仔を置き, 鼻窩を中心に前方-後方 (図 2b, 3a の A-P), 上方-下方 (図 2b, 3a の S-I) とし, 以下の記載はすべてこの方向用語に従った。

表 1 マウス胎仔の胎齢と尾体節数との関係

Age	No Ind.	Shal- low Ind.	T.S.																	Total									
			0-1	2-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15	16-17	18-19	20-21	22-23	24-25	26-27	28~												
9/ 0~24	14	7																											21
10/ 0~12	6		9	14	28	40	80	44	9	4																			234
10/12~24				1		8	16	38	42	9	4																		118
11/ 0~12							1	1	23	29	40	56	48	24	4														226
11/12~24												3	7	3	7	1	6	27											

ただし尾体節発生前のものは, 表 2 の一次口蓋発生段階の No Ind. および Shallow Ind. で分類 (数値は胎仔数)

表2 マウス胎仔の一次口蓋の発生段階と尾体節数との関係 (数値は胎仔数)

Stage	T. S.																
	— 0·1	2·3	4·5	6·7	8·9	10·11	12·13	14·15	16·17	18·19	20·21	22·23	24·25	26·27	28~		
No Ind.	20																
Shallow Ind.	7																
Oval (pit)		4	8	9													
Oblong (deep pit)				11	13	3											
Fusion					4	30	18	33	29	31	35	36	17	13	2	7	
Total	27	4	8	20	17	33	18	33	29	31	35	36	17	13	2	7	

一次口蓋の発生段階を以下に示す

No Ind. (No indentation of nasal placode) : 鼻板の肥厚はおこっているが、まだ鼻板の陥入は始まっていない

Shallow Ind. (Shallow indentation of nasal placode) : わずかな鼻板の陥入がおきている

Oval (pit) : 鼻板の陥入が進み、浅い卵円形の鼻窩ができています

Oblong (deep pit) : 鼻板の陥入はさらに進み、長楕円形の鼻窩ができ、その両側には内外両鼻突起の隆起が始まっている

Fusion : 鼻窩の後方端から内外両鼻突起の癒合が始まり、その癒合が進み鼻窩の開口部がしだいに小さくなっていく

ICR マウスでは胎齢9日から10日のはじめにかけて、まだ後肢芽は未発達であり、後肢芽が出現する直前ごろに、顔面領域では鼻板の形成とわずかな鼻板の陥入がみられた。

胎齢10日には後肢が出現し、70%がT. S. 6~11であった。顔面では、鼻板の陥入が進みそれに伴い鼻板の両側の内外両鼻突起の形成がおき、それに続きこの2つの鼻突起の癒合の開始と癒合の進行がみられた。内側鼻突起の方が早くから発達し、T. S. 6, 7 くらいになると、比較的広い鼻窩をはさんで内外両鼻突起が顕著になった(図4a)。鼻窩の後方端に位置する両鼻突起の移行部はisthmusと呼ばれている(図4a↑)。T. S. 6, 7 からT. S. 8, 9 にかけて鼻窩の後方端から内側鼻突起と外側鼻突起の癒合が始まった(表2)。以後も両鼻突起は、しだいに大きさと突出度を増し、また癒合も開口部付近では前方に進んだ(図4b)。

胎齢10 1/2 日では、70%ほどがT. S. 10~13であった。内外両鼻突起はさらに成長し、上顎突起も顕著になってきて、内外両鼻突起の癒合はさらに前方に進み、鼻窩の開口部はT. S. 12, 13 では下方部分の癒合した“comma shape” (Trasler (1968)²⁾)となり(図4c)、これ以後もますます鼻

窩は小さくなっていった。

胎齢11日では、70%以上がT. S. 14~21であった。T. S. 14, 15 以後では突起間の谷にあたる部分や内外両鼻突起の周囲が盛り上がるように成長するため、実体顕微鏡下では突起の凹凸が目立たなくなった。走査電子顕微鏡による観察では、左右の内側鼻突起間もつながり始め、早い時期に癒合の終わった鼻窩の後方部とともに、口窩の一次口蓋を形成し始めた(図4d)。

胎齢11 1/2 日ではT. S. 18, 19 以上であり、しだいに鼻窩の開口部は狭まり突起の凹凸は目立たなくなり、一次口蓋の形をなし始めた。

2. 光学顕微鏡による観察

鼻突起(とくに内側鼻突起)に対するfrontal 1 μm 切片(図2bのA—P面に平行にI→S方向に切っていく。3cの1→4の方向)の連続観察を行うと、まず内側鼻突起先端の断面が現れ、つぎには外側鼻突起先端の断面が内側鼻突起と離れた状態で現れた(図3c-1, 図5)。上方(図3cで1から4への方向)の切片になるに従い、引き続き鼻突起の大きさは増し、両鼻突起の後方端は完全に離れた状態から互いに接触(contact)した(図3c-2, 図6, 7)。その位置は、T. S. 10, 11

で内側鼻突起の下方端から 600~700 μm , T. S. 16, 17 では 200~300 μm 程度であった。さらに上方 (図 3c-2 と 3 の間) では接触部分が増加して、上皮壁がみられた。さらに上方 (図 3c-3) では上皮壁内には dense particles を持った変性細胞が増加していた (図 8)。より上方 (図 3c-3 と 4 の間) で上皮壁は消失して鼻腔側と口腔側の上皮に分かれ、その間には顔面間葉組織が存在していた。その場所よりさらに上方 (図 3c, d の O. M. 付近) で、鼻腔側上皮と口腔側上皮がつながっている場所があり、これは口鼻膜 (oronasal membrane) で、のちに一次後鼻孔ができる部分である。この場所は発生が進むにつれ内側鼻突起の下方端から、より上方の位置に移動していった。

以上のような 1 μm 連続切片による観察は、これまでの研究で用いられた coronal 方向の切片⁴⁾と同様に、frontal 方向の切片が両鼻突起の接触を研究するのに十分であることを示している。また実際の切片作製において、この方法によると coronal 方向の切片を採るよりはるかに少数の切片で、先ほど述べたような突起の表層から接触、上皮壁、間葉組織による交通という癒合の全過程を含んだ像が得られ、1 μm の連続切片の観察を行う場合非常に能率的な方法である。このような frontal 方向の連続観察に加え、coronal 方向の切片により鼻窩内上方の接触部 (図 3c-5) を中心とした観察をし、またパラフィン連続切片の再構築を行った結果、両鼻突起の接触部は図 3 の太い点線で示すような範囲に存在していることがわかった。また内外両鼻突起の癒合は、鼻窩の開口部付近で後方から前方へ進むという報告があるが²⁾、発生段階を追って立体的に観察してみると、両鼻突起自身の成長と鼻板の陥入が癒合と同時に進行しており、isthmus 付近 (図 3-a) で最初の接触 (initial contact) が起こったのち、それに続いて癒合は isthmus を原点としてみると、鼻窩の内部でも同時に後上方から前下方 (図 3- $\rightarrow$) に進んでいるというべきである。

本研究では、上に述べたような接触部付近を中

心とした観察を行い、進行する癒合像を詳細に記述した。ここで上のような時間的な変化を考慮すると、ある発生段階の連続観察では、接触部付近において、frontal 方向では接触部より下方の位置 (図 3c-1), coronal 方向では接触部より前方の位置 (図 3c-6) は、これから接触がおこる場所であると予想されるので、以下の記載では“接触予定部”として扱った。

癒合のおこる T. S. 6, 7 以上の胎仔において、2 T. S. ずつのグループごとに、内外両鼻突起の全周を被っている上皮を観察したが、図 5 の a~e に示した 5 部位に重点を置いて比較した。全グループにはほぼ共通したことは、1) 両鼻突起の外周は単層扁平上皮から 2~3 層の重層扁平上皮 (図 5b, c), 2) 鼻窩内は多列円柱上皮であり (図 5d, e), 3) 接触部あるいは接触予定部において、外周と鼻窩内上皮の移行部の上皮最表層に特殊な細胞が存在し (図 6~8, 10, 12~14), 4) 内外両鼻突起の上皮像に差がみられる (図 5~7, 10, 12, 13) ことであった。

しかし癒合の進行は、胎仔の成長途上の事象であり、顔面領域においても全体の大きさの増大や突起の突出と成長がおこっており (図 4a~d), 両鼻突起の接触部の切片を中心に各発生段階のものを比較すると、あとで述べるように上皮組織像に若干の差がみられた。以上より、典型的な像としてまとめられる T. S. 8, 9~16, 17 を中心に記述し、接触に関与する最表層上皮細胞をはっきりとらえられなかった癒合開始期付近の T. S. 6, 7 と、内外両鼻突起ともによく成長し癒合も進んだ T. S. 18, 19 以上の記述を付け加え、全体の記述とした。

1) T. S. 8, 9~16, 17

外周は最表層に Toluidine Blue 薄染の扁平な周皮 (periderm) を持つ、厚さ 5~20 μm くらいの単層扁平上皮 (内側鼻突起), または 2~3 層の扁平重層上皮 (外側鼻突起) で被われていた (図 5b, c)。鼻窩内の内側鼻突起と外側鼻突起の表面は、多列円柱上皮で被われ、上皮細胞の核は卵形であり、しばしば表層付近に分裂像がみられた。

表層付近よりかなり頻度は低いが、基底層にも分裂像がみられることがあった(図5d, e)。また円柱上皮の表面には繊毛の発達もみられた。鼻窩の開口部に近い部分では、内側鼻突起は背の高い円柱上皮に被われていたが(図5d)、外側鼻突起は背の低い円柱上皮に被われていた(図5e)。また、鼻窩内中央付近の内側鼻突起には、ヤコブソンの器官が発達し上皮の肥厚部として観察された(図10a)。鼻窩の奥深くすなわち図3c-4付近の切片では、内外両側ともに背の高い円柱上皮となっていた(図9)。

接触部および接触予定部において、外周上皮と鼻窩内上皮はつぎのような特徴から明らかにほかから区別された。鼻窩の開口部付近(図3c-1, 2)では、この移行部は細胞配列の乱れた厚さ20~50 μm の3~5層の上皮であった(図5~7, 12, 13)。鼻窩内中央付近の移行部(図3c-5)は、ヤコブソンの上皮肥厚がここまで続いてきているため、内側鼻突起は5~10層であり、外側鼻突起は2~3層の上皮であった(図10)。鼻窩の開口部付近の移行部でも内外両鼻突起に差がみられ、内側鼻突起は Toluidine Blue 濃染で核が長楕円体または不規則な角張った形の基底層の細胞と、それより明るく表面に平行な方向に核の並んでいる表層細胞が、比較的是っきり区別された。一方外側鼻突起では基底層と表層の細胞はほとんど区別がなく、明調な細胞でやや丸みをおびた核を持っていた。細胞配列の乱れは外側鼻突起に顕著にみられた(図5~7)。両鼻突起ともに、T. S. 8, 9~12, 13では1 μm 切片でみると大半の上皮細胞は、直径1~5 μm の丸い Toluidine Blue 濃染のいわゆる dense particles を持ち、それらは基底層から表層まで分布していた。また核濃縮を示す細胞もみられた。これらの細胞の比率は、発生段階が進むにつれて減少し、T. S. 14~17では半分に減少した。そして、接触部の移行部上皮最表層には、核、細胞質ともに基底層より大きな細胞が区別された(図6→, 7→, 8→, 10b→, 12b→)。これらの細胞は両鼻突起各々の最表層からあたかもとび出しているようにみえた。接触部に近接している

両鼻突起の離れている切片と比べて、両鼻突起の基底膜間の距離はほぼ同様であり、またこれらの大きな最表層細胞の存在を除けば細胞層の数にも変化がなく、これらの大きな細胞が両鼻突起の間隙を埋め両鼻突起をつないでいるようにみえた。鼻窩の開口部付近の接触部を示す走査電子顕微鏡像が図11である。両鼻突起の接触部には各々の突起表面の細胞とは異なった配列をしている細胞が明らかであった。これらの細胞は、両鼻突起による谷の底の部分に線状に並んでいた。図11a→に示すように、すでに癒合が終わって浅い溝のようになった部分にはこのような細胞はみられず、これらの細胞が接触部にのみ存在することが観察された。鼻窩の開口部付近の接触部の切片図6, 7の明るい細胞は、鼻窩内部の切片図8の上皮壁の鼻腔端にとび出したように明るい細胞に類似しており、鼻窩の開口部付近の接触部から内部の接触部にかけても同様の最表層上皮細胞により両鼻突起がつながれていることがわかった。また、鼻窩内中央部の接触部をとらえた coronal 切片では、1枚の切片内に同時に5~10個の最表層細胞が出現して両鼻突起をつなぐことが多く(図10)、これは鼻窩内部の接触部が coronal 方向に沿って並んでいることを示していた(図3)。これらの最表層細胞の核は、極めて多様な形をしており、卵形のもの、球形のもの、一部が凹んだ不規則な形のもの、などがおもであった。このため大きさの測定は困難であったが、1 μm 切片で測定するとおよそ長径15 μm 、短径10 μm であった。これに対し基底層の細胞の核は大きさが変化に富んでいたが、平均しておよそ長径10 μm 、短径5 μm であった。

最表層細胞の細胞質はほかの細胞とは比べものにならないほど豊富で明るく、この細胞質中に dense particles を持つことも多かった。また両鼻突起が40~60 μm 離れている接触予定部にも、ときに最表層に核、細胞質ともに大きくややとび出したようにみえる明るい細胞が観察されることがあった(図12a→, 13a→)。このような上皮変化が始まる部位は、発生段階により異なり、たと

えば T. S. 12, 13 では接触部から $50\mu\text{m}$ くらい離れた位置であった。

鼻窩内の上皮壁が形成されている部分(図 3 c-3)では、前述したように上皮壁の鼻腔側端には、接触部を示す明るくとび出したような細胞がみられたが、上皮壁の中心付近には上述した最表層細胞の特徴を示すものがなく、基底層細胞の特徴を示す細胞のみが観察され、これまで述べてきた最表層細胞が接触に関係していることを示唆していた。上皮壁の外周側の細胞については、外周の上皮なのか移行部の最表層上皮なのかははっきり区別できないことが多かった。

2) T. S. 6, 7

T. S. 6, 7 では内外両鼻突起はまだあまり発達しておらず、とくに外側鼻突起は発達が悪かった。そのため切片作製の角度の微妙な差によって組織像は変化し、またこれ以後の発生段階のように上皮の分化が進んでおらず、基底層と表層の細胞の区別は難しく、両鼻突起をつなぐ特殊な最表層細胞をとらえることはできなかった。実体顕微鏡観察から両鼻突起の最初の接触は、T. S. 6, 7~8, 9 ごろ始まると予想されるが、組織像では T. S. 6, 7 ではほとんど接触は始まっていないと考えられた。

T. S. 8, 9~16, 17 と同様な dense particles を持つ細胞はかなりの数観察された。

3) T. S. 18, 19 以上

外周、移行部ともに T. S. 8, 9~16, 17 にほとんど近い像を示したが、両部ともに最表層細胞が T. S. 8, 9~16, 17 より Toluidine Blue 薄染傾向が強く、その下の濃染傾向の強い上皮とはっきり区別された。また T. S. 12, 13~16, 17 でみられたような内外両鼻突起の上皮の差はほとんどみられなかった。細胞は T. S. 12, 13~16, 17 よりやや大きく、 $1\mu\text{m}$ 切片の測定では表層細胞の核はおよそ長径 $15\sim 20\mu\text{m}$ 、短径 $10\mu\text{m}$ 程度で扁平傾向があり、基底層の細胞の核は長径 $10\mu\text{m}$ 、短径 $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度であった。また接触部および接触予定部の両鼻突起移行部上皮に dense particles を持つ細胞は T. S. 18, 19 では数少なく、T. S.

20, 21 以後ではほとんどみられなかった(図 14 a, b)。

以上の観察から、各発生段階を通じて両鼻突起の外周と鼻窩内上皮の移行部の上皮において、内外両鼻突起の癒合の最初の段階である接触がおき、その接触部は図 3 に太い点線で示すような範囲であった。そしてそこには形態学的に特殊な最表層上皮細胞が存在することがわかった。また接触予定部および接触部の両鼻突起の上皮中の dense particles を持つ細胞は、T. S. 6, 7~16, 17 では癒合部付近にかなりの数存在していたが、そのほかの時期ではたとえば突起の陥入部などにも広く分布しており(未発表)、分布は時期により変化し、癒合とだけ関係する事象ではなく、鼻突起の形成にも大きく関係するものであろうと考えられる(準備中)。

3. 電子顕微鏡による観察

両鼻突起の癒合における接触部の電子顕微鏡による観察を行ったが、光学顕微鏡による観察とは異なり限られた範囲の観察しかできないので、その観察部位が確実に突起の接触部であることが重要である。そこで図 15 c に示すように frontal 方向に $100\mu\text{m}$ の連続切片を作り、接触部を含むことを確認した切片(図 15 a, b)から、frontal 方向に垂直な超薄切片(図 15 d, e)を作製した。図 15 b, c に示すように図 15 d は図 15 e よりも後方の切片であり、図 15 e は接触部であり、図 15 d はすでに接触し新しく外表層となっていく部分(図 11 a ーの浅い溝となった部分に相当)である。図 16 も同様に frontal 方向の $150\mu\text{m}$ 切片を垂直に切ったものであり、図 15 c の E に相当する付近の切片である。図 15 e, 16 のような frontal 方向に垂直な切片における V 字型の底の部分が接触部、その下の細胞層はすでに接触した後の上皮壁部、そして V 字型の開いている部分は接触予定部であり、光学顕微鏡で連続的に観察した像(図 5~9)に対応する。図 16 a, b は連続切片であり V 字型の底の部分でまわりの細胞からとび出し、それらとあまり接触面を広く持たない細胞が、両鼻突起をあたかも橋のようにつないでいた。この細胞が

光学顕微鏡で両鼻突起をつなぐようにみえた接触に関与すると思われた細胞(図6~8, 10, 12~14)であり, 走査電子顕微鏡では両鼻突起表面の細胞とは異なった配列をして両鼻突起間にみられた細胞である(図11b)。接触予定部上皮の最表層細胞の表面近くには, 後述するように細胞間結合に関係する繊維(filaments)の束が表面に平行に走っており, これは数個の細胞にわたって, 細胞表面から同じ深さのところを走っているようにみえた(図16a, c→)。このような繊維束は, すでに接着した部分の上皮細胞中にも連続的に認められ(図16a, d→), 繊維束の存在する細胞が, かつて接触前には上皮最表層細胞であり, 接着後は上皮最表層ではなくなり上皮壁内に位置するようになって, もとの繊維の走行が残っていると考えられ, この部分の細胞が接触し, そして接着していく過程上にあることを示唆している。また frontal 切片図17, 18は, 図15e, 16の接触に関与すると思われるV字型の底の細胞を, これに垂直に底に沿って接触方向に切ったものである。

このような frontal 方向の切片, およびそれに垂直な切片において, 突起の接触部の場所を確認した上で, 光学顕微鏡でみられた突起の接触に関与する最表層上皮細胞に焦点を合わせて電子顕微鏡観察を行った。光学顕微鏡観察と同様に, T. S. 2 ずつのグループごとに観察したが, 光学顕微鏡レベルでは広い範囲の連続観察のため, 胎仔の成長およびそれに伴う突起の形状とも関係して上皮組織像に若干の差がみられた。しかし電子顕微鏡レベルで最表層細胞を観察すると, 早い時期では固定の影響を受けやすく, 細胞膜が断裂し細胞質が疎になりやすいなどの像がみられ, 発生の進行とともに細胞は大きさを増した。細胞微細構造に関しては, 細胞内小器官(organelles)や接着装置複合体(junctional complex, 以下 J. C. と略す)の発達などに発生段階による顕著な差はみられなかった。

接触部において直接両鼻突起間をつないでいる細胞と, 光学顕微鏡観察において外周と鼻窩内の上皮との間の移行部に一致する範囲の最表層上皮

細胞には差がみられず, これらの最表層上皮細胞は基底層の細胞より, 核, 細胞質ともに大きかった。核は多様な形をしており, 卵形のもの, 球形のもの, 一部が凹み複雑な形をしたものなどがあった。核質は heterochromatin 核膜を縁どるように付いているのみで明るかった。細胞質は豊富であり, 胎仔の上皮細胞一般と同様な細胞内小器官を持ち, ミトコンドリアは固定の影響と思われる像のばらつきがみられた。遊離リボソーム(free ribosomes)が非常に発達し, それらは5~10個くらいのポリソーム(polysomes)となっていた。基底細胞も同様な細胞内小器官を持っていた。

さて, 両鼻突起が接触する際, 両鼻突起の最表層上皮間に新しく作られる接触面と, もとからつながっている同側の鼻突起内の最表層上皮の隣接細胞間では, 上皮の接着様式になんらかの違いがあるのではないかという考えから, 最表層上皮間の J. C. を観察した。

その結果, 両者ともに細胞表面から基底側にかけて, タイト結合(tight junction)様の構造, 接着小帯(intermediate J.), ギャップ結合(gap J.), デスモゾーム(desmosome)が観察された。図17は frontal 切片で内側鼻突起と外側鼻突起を1つの細胞がつないでおり, この細胞がどちらの突起由来で新接触面はどこか, 判別が困難であるが, この細胞と両鼻突起間の接着装置をみると, 内側鼻突起側にも外側鼻突起側にも, 上で述べたと同様の接着装置がどちら側にも観察された。しかしながら新たに接触した面では, あとで述べるような非対称と思われるデスモゾーム様構造が観察された。

最表層細胞の表面に近いところは, 細胞間隙が非常に狭くその部分の細胞質内には細胞膜に沿って繊維の集合がみられた(図17d)。表面からつぎに深い位置には, 細胞膜に電子密度の高い裏打ちを持った接着小帯が発達していた(図17e)。ギャップ結合(図17e), デスモゾーム(図17c, e)もしばしば観察された。接着小帯, ギャップ結合, デスモゾームにおいて2つの細胞膜を含む overall thickness はそれぞれ, 180~250Å, 150Å,

および 300Å であった。図18は、両鼻突起の最表層上皮間に左右非対称なデスモゾーム様の電子密度の高い構造が数個並んでいるのを示す。その付近に張原繊維 (tonofilaments) の方向は斜めであるが通常の対称なデスモゾーム構造もみられた。図17c も非対称なデスモゾーム構造と思われる構造を示していたが、隣接切片が観察できなかったので明確にできなかった。

これまで述べてきたように上皮最表層の細胞表面近くには繊維が発達しており、とくに J. C. の付近には常に繊維が観察された。これらは intermediate filaments とそれよりやや細い繊維であった(図17d)。また図16では同側の上皮最表層細胞の表面付近に、数個の細胞に繊維が束になって平行な方向に走っており、すでに接着した部分で接着前に最表層であったと思われる細胞にも、それに連絡した繊維束がみられた。

考 察

本研究の結果から ICR マウスでは、2～3日の短い期間に鼻板の形成、内外両鼻突起の癒合から一次口蓋の形成までがおこる。これは体節数でみると30個前後形成される期間であった。これまでの一次口蓋形成の研究における発生段階のとり方は、単に胎齢だけによるもの^{1,4-6,19)}、T. S. によるもの^{20,22,25,26)}、外表からみた形態により分類したもの^{2,21,27,28)} などさまざまである。しかし本研究の結果が示すように ICR マウスの同腹胎仔間の T. S. のばらつきは、通常4～7もあり、また同胎齢の異腹胎仔間では T. S. の分布範囲はさらに広く、10～15差のあるものもあった(図1)。このため胎齢だけによる発生段階のとり方では、急速な形態形成過程を段階的に追うことはできないと考えられる。T. S. は成長の1つの指標であるが、Trasler(1968)²⁾が C57BL マウスで観察したと同様、ICR マウスにおいても上で述べたような一次口蓋形成に至る形態変化は、T. S. にはほぼ並行することが確認できたので(表2)、T. S. を基本にした発生段階で考えるべきであると思われる。

1. 光学顕微鏡による観察

顔面突起から一次口蓋が形成される過程について歴史的には多くの論争があったが、現在ではゲッ歯類においては、鼻板の陥入と内外両鼻突起の癒合によって、一次口蓋および最終的な鼻窩が作られるという説にほぼまとまってきた²⁹⁻³⁴⁾。鼻突起同士の癒合に関して、Trasler (1968)²⁾は内外両鼻突起の移行部分は isthmus であり、癒合は isthmus 付近から始まり、鼻窩の開口部で後方から前方へ進むとした。しかし本研究が示すように、両鼻突起同士の癒合は、両鼻突起自身の成長と同時に進行し、図3に示すように isthmus を原点としてみると、鼻窩の開口部ばかりではなく鼻腔内においても、後上方から前下方へ進んでいると考えるべきである。そして癒合の先端である接触部は、図3の太い点線で示す部分のように、各発生段階を通じて、常に外周の扁平上皮と鼻窩内の多列円柱上皮との移行部であり、この部は配列の乱れた3～5層の上皮細胞より成り、上皮最表層には両鼻突起の表層細胞の連続からとび出して、突起と突起の間を埋めるように両鼻突起をつないでいる特殊な細胞が観察された。

これまで、Burk, Sadler と Langman(1979)²¹⁾は、癒合予定部および癒合部は鼻窩内の円柱上皮と外周上皮の移行部であると記載し、Gaare と Langman (1977)⁴⁾は、癒合予定部についての場所的な記載はしていないが、その場所は扁平な表層細胞に被われた2～3層の重層立方上皮であるとした。しかし、癒合予定部および癒合部に形態学的に特殊な最表層上皮細胞が存在することは報告されていなかった。これまでに電子顕微鏡レベルの研究から、両鼻突起の癒合部上皮表面には糖皮が存在し^{4,19-23)}、表層細胞間に膜の特殊化した細突起による接触がおこり、それに続き細突起より大きな細胞質突起がかみ合うこと^{4,25)}が報告されていたが、そのように特殊な機能を持った細胞の形態学的特徴が本研究によりさらに明らかにされた。

発生段階を追った観察の結果、このタイプの細胞は癒合開始から、癒合が進行していく経過中、

癒合部の先端には常に存在していた。このことは両鼻突起同士の癒合のメカニズムは、どの発生段階でもほとんど同じであることを示唆していると考えられる。

発生過程において、2つの突起の癒合がおこる神経管や二次口蓋についての研究では、この両器官とも癒合前には2つの突起はまったく離れており、isthmusに移行部をもつ一次口蓋領域とはこの点において異なっている。神経管、二次口蓋ともに突起の先端が癒合部および癒合予定部である。神経ヒダ (neural fold) の接触については、Geelen と Langman (1977)¹⁷⁾(1979)¹⁸⁾ は、マウスでは癒合は単純な一方向の “Zipper-like process” ではなく、神経ヒダの位置する脳の場所により最初に神経ヒダ同士をつなぐ細胞も異なっており、扁平な表層上皮の場合もあれば、円柱状の神経上皮である場合もあることを示した。菱脳 (rhombencephalon) 領域をつなぐ膨んだ表層外胚葉細胞または神経堤細胞 (neural crest cells) と、本研究で観察された最表層上皮細胞は、光学顕微鏡像が似ているように思われるが、本研究では場所や発生段階による差はみられなかった。二次口蓋においては癒合予定部上皮は、扁平な表層細胞と立方形の基底細胞層からなることを Deangelis と Nalbandian (1968)³⁵⁾, Hayward (1969)³⁶⁾, Chaudhry と Shah (1973)³⁷⁾, Hinrichsen と Stevens (1974)³⁸⁾, Souchon (1975)¹⁰⁾ が示したが、突起の接触については最初の接触は表層細胞によるが、接触前後で光学顕微鏡レベルの形態的な変化はみられないという観察³⁶⁾, 表層細胞は壊れ基底層が昇ってきてそれにより接触するという観察^{37,38)}があったが、1~2 μ mの準超薄切片による観察は、ほとんどなされておらず、透過電子顕微鏡所見も、一部の細胞内小器官や J. C. に限られていた。走査電子顕微鏡では癒合予定部の領域の表層細胞表面が変化するという観察¹⁴⁻¹⁶⁾があるが、まさに接触せんとしている細胞自身を明確にとらえていないので詳細な比較はできない。しかし、本研究で観察されたような最表層上皮細胞は報告されていない。

鼻窩および、外周上皮と鼻窩内上皮の移行部において、内側鼻突起と外側鼻突起の上皮に差が認められたが、これは両鼻突起の成長の時期がずれていることに関係していると考えられる。鼻窩の上皮については、T. S. 17 までの早い時期では突起の下方端から中央付近までは、外側鼻突起は背の低い円柱上皮であり、内側鼻突起は背の高いよく分化した多列円柱上皮であったが、突起の上方付近では内外ともに背の高い円柱上皮となり、また T. S. 18 以上の遅い時期では内外とも全域にわたり背の高い円柱上皮となっていた。外側鼻突起は内側鼻突起より遅く成長し始め、急速に成長が進むので、突起の上皮の分化が突起の成長に伴うと考えるならば、早い時期にみられる内外の上皮の差が説明できるように思われる。また移行部の上皮についても、早い時期の外側鼻突起は表層と基底層の細胞に区別がないが、内側鼻突起は表層と基底層の細胞に分かれ、また遅い時期のものは内外ともに表層と基底層の細胞の区別がはっきりしていたことから、これも外側鼻突起が遅く成長してくることに関係していると考えられる。分化の程度に差のある内外両鼻突起の上皮間に接着がおこるという事実は注目すべきことであろう。

2. 電子顕微鏡による観察

空間的に変化していく現象を、限られた範囲の観察しかできない電子顕微鏡によってとらえるには、その観察部位の同定を確実にすることが、非常に重要である。ところが、これまでの一次口蓋の癒合部における電子顕微鏡による研究^{4,21)}においては、両鼻突起同士の癒合部における場所の同定が不十分であり、正確に接触部をとらえているとはいえない。そこで本研究においては、図15に示すような方法でこの同定を確実に行った。このようにしてとらえた接触部において、両鼻突起がまさに接触せんとしている部分の最表層細胞だけでなく、鼻突起外周と鼻窩内上皮の移行部で、将来癒合するであろうと想定される癒合予定部の最表層細胞も特徴的な形態を持っていることが明らかにされた。

さまざまな器官形成中の J. C. の発生について

は、多くの研究がなされてきたが⁴⁰⁻⁴⁷⁾、一次口蓋形成時の内外両鼻突起の J. C. については、明確な記載はなかった⁴⁾。本研究により、鼻突起同士の癒合部において、同側鼻突起内の隣接した最表層細胞間には、タイト結合、接着小帯、ギャップ結合、デスモゾームの4つのおもな要素からなる J. C. が観察された。一方、両鼻突起の新接触面での急速な J. C. の形成の初期過程をとらえることは非常に難しく、両鼻突起の新接触面にも上の4つのよく発達した J. C. がみられるほかに、非対称を示唆するデスモゾーム様構造が観察されたことがおもな所見であった。

J. C. 付近には非常に多くの繊維の発達がみられ、これらの繊維は intermediate filaments とそれよりやや細い microfilaments と思われる繊維であった。この一次口蓋領域を含め形態形成期の intermediate filaments に関する報告はまだほとんどないが⁴⁸⁻⁵¹⁾、外胚葉性上皮の起源であるマウスの二層性胚盤 (bilaminar germ disc) の上皮には、すでに desmosome tonofilament complex をなしている cytokeratin タイプの intermediate filaments の存在が報告されている⁴⁹⁾。両鼻突起の癒合部の最表層上皮にもデスモゾームに関係した張原繊維 (tonofilaments) が数多くみられ、これらは desmosome tonofilament complex をなしている cytokeratin タイプの intermediate filaments であると考えられる。また microfilaments に関しては、マウスの神経管の形成時において、神経溝 (neural groove) 形成時には Actin filaments が神経上皮の基底層に存在し、神経ヒダの接触時には神経上皮の表層付近と、神経ヒダ先端の表層外胚葉細胞の表層に存在することが報告されている⁵²⁾。本研究でみられた intermediate filaments および Actin filaments と思われる繊維の同定は、今後の課題である。

両鼻突起の各々について、もともとつながっていた同側鼻突起の最表層細胞間には、多くの繊維が関連した J. C. の発達がみられたが、これらは両鼻突起の接触によって引きおこされた構造変化であると考えられる。

神経管形成における神経ヒダの接触は、電子顕微鏡レベルでは、まず大きな細胞質突起および指状の突起による鉗合がおき、癒合した表層上皮間には、本研究の最表層上皮間と同様に繊維成分が多くかなり電子密度の高い膜がみられるが、J. C. の分化はとらえられておらず、また接触に関与した神経上皮間にはそれらの分化はみられていない¹⁸⁾。二次口蓋においては、癒合部には新しく形成されたデスモゾームがみられるという報告があるが³⁵⁻³⁷⁾、そのようなデスモゾームはみられないという研究もある³⁹⁾。これは場所的、時間的に新接触面の J. C. の形成をとらえることの難しさによるものであろう。

3. 細胞死について

発生中のさまざまな器官において細胞死が観察されているが⁵³⁾、本研究において光学顕微鏡レベルで T. S. 6, 7~16, 17 の両鼻突起の癒合予定部と癒合部の上皮にみられた dense particles を持つ細胞は、Silver と Hughes (1973)⁵⁴⁾、Garcia-Porrero ら (1979)⁵⁵⁾ がレンズにおいて観察し、Schlüter (1973)⁵⁶⁾、Geelen と Langman (1977)¹⁷⁾ が神経管において観察した細胞死の組織像と同様のものと考えられる。本研究で観察された dense particles を持った細胞は癒合予定部、癒合部以外にも存在し、また時期の早いもののほど多く、さらにはわずかな鼻板陥入や鼻窩がわずかに形成された時期にも存在していた (未発表)。これは、二次口蓋領域における上皮壁破壊に役割を果たす programmed cell death⁵⁷⁾ とは異なった役割を持ち、突起の癒合にだけ関係しているのではなく、鼻板の陥入や突起の成長を含んだ形態形成に関係の深いものであろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました江藤一洋教授、生理学研究所の浜清教授に謹んで感謝の意を表します。また懇切丁寧なご指導とご助言をいただきました東京大学医科学研究所の広沢一成教授、生理学研究所の小坂俊夫助教授に心から感謝します。さらに本研究にご援助、ご協力いただきました生理学研究所液性情報部門、東京大学医科学研究

所微細形態部門, 本学顎研発生部門の方々に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Lejour-Jeanty, M. : Etude morphologique et cytochimique du development du palais primaire chez le rat (complete des observations chez le lapin et l'homme). Arch. Biol. 76 : 97-168, 1965.
- 2) Trasler, D. G. : Pathogenesis of cleft lip and its relation to embryonic face shape in A/J and C57BL mice. Teratology 1 : 33-50, 1968.
- 3) Pourtois, M. : Morphogenesis of the primary and secondary palate. In Slavkin, H. S. & Bovetta, L. S. (eds.) : Developmental aspects of oral biology. New York, 1972, Academic Press, 81-108.
- 4) Gaare, J. D. and Langman, J. : Fusion of nasal swellings in the mouse embryo : Surface coat and initial contact. Am. J. Anat. 150 : 461-476, 1977.
- 5) Gaare, J. D. and Langman, J. : Fusion of nasal swellings in the mouse embryo : Regression of the nasal fin. Am. J. Anat. 150 : 477-500, 1977.
- 6) Gaare, J. D. and Langman, J. : Fusion of nasal swellings in the mouse embryo. DNA Synthesis and histological features. Anat. Embryol. 159 : 85-99, 1980.
- 7) Moran, D. and Rice, R. W. : An ultrastructural examination of the role of cell membrane. Surface coat material during neurulation. J. Cell Biol. 64 : 172-181, 1975.
- 8) Sadler, T. W. : Distribution of Surface coat material on fusing neural folds of mouse embryos during neurulation. Anat. Rec. 191 : 345-350, 1978.
- 9) Greene, R. M. and Kochhar, D. M. : Surface coat on the epithelium of developing palatine shelves in the mouse as revealed by electron microscopy. J. Embryol. exp. Morph. 31 : 683-692, 1974.
- 10) Souchon, R. : Surface coat of the palatal shelf epithelium during palatogenesis in mouse embryos. Anat. Embryol. 147 : 133-142, 1975.
- 11) Pratt, R. M. and Hassell, J. R. : Appearance and distribution of carbohydrate-rich macromolecules on the epithelial surface of the developing rat palatal shlf. Devel. Biol. 45 : 192-198, 1975.
- 12) Bancroft, M. and Bellairs, R. : Differentiation of the neural plate and neural tube in the young chick embryo. A study by scanning and transmission electron microscopy. Anat. Embryol. 147 : 309-335, 1975.
- 13) Waterman, R. E. : Topographical changes along the neural fold associated with neurulation in the hamster and mouse. Am. J. Anat. 146 : 151-172, 1976.
- 14) Waterman, R. E., Ross, L. M. and Meller, S. M. : Alterations in the epithelial surface of A/Jax mouse palatal shelves prior to and during palatal fusion : A scanning electron microscopic study. Anat. Rec. 176 : 361-376, 1973.
- 15) Waterman, R. E. and Meller, S. M. : Alteration in the epithelial surface of human palatal shelves prior to and during fusion : A scanning electron microscopic study. Anat. Rec. 180 : 111-136, 1974.
- 16) Meller, S. M., De Paola, D. P., Barton, L. H. and Mandella, R. D. : Secondary paratal development in the New Zealand white rabbit : a scanning electron microscopic study. Anat. Rec. 198 : 229-244, 1980.
- 17) Geelen, J. A. G. and Langman, J. : Closure of the neural tube in the cephalic region of the mouse embryo. Anat. Rec. 189 : 625-640, 1977.
- 18) Geelen, J. A. G. and Langman, J. : Ultrastructural observations on closure of the neural tube in the mouse. Anat. Embryol. 156 : 73-88, 1979.
- 19) Water, R. E. and Meller, S. M. : Nasal pit formation in the hamster : A transmission and scanning electron microscopic study. Devel. Biol. 34 : 255-266, 1973.
- 20) Smuts, M. S. : Concanavalin A binding to the epithelial surface of the developing mouse olfactory placode. Anat. Rec. 188 : 29-38, 1977.
- 21) Burk, D., Sadler, T. W. and Langman, J. : Distribution of surface coat material on nasal folds of mouse embryos as demonstrated by concanavalin A binding. Anat. Rec. 193 : 185-196, 1979.
- 22) Figueroa, A. H. and Pratt, R. M. : Autoradiographic study of macromolecular synthesis in the fusion epithelium of the developing rat primary palate in vitro. J. Embryol. exp. Morph. 50 : 145-154, 1979.
- 23) Eto, K., Figueroa, A., Tamura, G. and Pratt, R. M. : Induction of cleft lip in cultured rat embryos by localized administration of tunicamycin. J. Embryol. exp. Morph. 64 : 1-9, 1981.
- 24) West, R. W. : Superficial warming of epoxy

- blocks for cutting of 25–150 μ m sections to be resectioned in the 40–90 nm range. *Stain Technol.* 47 : 201–204, 1972.
- 25) Millicovsky, G. and Johnston, M. C. : Active role of embryonic facial epithelium : New evidence of cellular events in morphogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 63 : 53–66, 1981.
 - 26) Sulik, K. K., Johnston, M. C., Ambrose, L. J. H. and Dorgan, D. : Phenytoin (Dilantin)-induced cleft lip and palate in A/J mice : A scanning and transmission electron microscopic study. *Anat. Rec.* 195 : 243–256, 1979.
 - 27) Tamarin, A. and Boyde, A. : Facial and visceral arch development in the mouse embryo : a study by scanning electron microscopy. *J. Anat.* 124 : 563–580, 1977.
 - 28) Warbrik, J. G. : The early development of the nasal cavity and upper lip in the human embryo. *J. Anat.* 94 : 351–362, 1960.
 - 29) Hochstetter, F. : Über die Inneren Nasengänge oder primitiven Choanen. *Verh. Anat. Ges.* 6 : 145–151, 1891.
 - 30) Hochstetter, F. : Über die Bildung per primitiven Choanen beim Menschen. *Verh. Anat. Ges.* 7 : 181–183, 1892.
 - 31) Fischel, A. : Entwicklung des Menschen. Wien und Berlin, 1929. Verlag von J. Springer.
 - 32) Veau, V. : Hasenscharten menschlicher keimlinge auf der Stufe 21–23 mm. *SSL. Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 108 : 459–993, 1938.
 - 33) Veau, V. : Hasenscharten bei Hundekeimlingen von 11–14 mm. *SSL. Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 111 : 433, 1942.
 - 34) Streeter, G. L. : Developmental horizons in human embryos. *Cont. Embryol. Carn. Instn. Washington* 32 : 133–203, 1948.
 - 35) Deangelis, V. and Nalbandian, J. : Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior to and during secondary palate formation. *Archs oral Biol.* 13 : 601–608, 1968.
 - 36) Hayward, A. F. : Ultrastructural changes in the epithelium during fusion of the palatal processes in rats. *Archs oral Biol.* 14 : 661–678, 1969.
 - 37) Chaudhry, A. P. and Shah, R. M. : Palatogenesis in hamster. II. Ultrastructural observations on the closure of palate. *J. Morph.* 139 : 329–350, 1973.
 - 38) Hinrichsen, C. F. L. and Stevens, G. S. : Epithelial morphology during closure of the secondary palate in the rat. *Archs oral Biol.* 19 : 969–980, 1974.
 - 39) Farbman, A. I. : Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Devel. Biol.* 18 : 93–116, 1968.
 - 40) Decker, R. S. and Friend, D. S. : Assembly of gap junctions during amphibian neurulation. *J. Cell Biol.* 62 : 32–47, 1974.
 - 41) Madara, J. L., Neutra, M. R. and Trier, J. : Junctional complexes in fetal rat small intestine during morphogenesis. *Devel. Biol.* 86 : 170–178, 1981.
 - 42) Humbert, F., Montesano, R., Perrelet, A. and Orci, L. : Junctions in developing human and rat kidney : A freeze-fracture study. *J. Ultrastruct. Res.* 56 : 202–214, 1976.
 - 43) Fisher, S. K. and Linberg, K. A. : Intercellular junctions in the early human embryonic retina. *J. Ultrastruct. Res.* 51 : 69–78, 1975.
 - 44) Ginzberg, R. D. and Gilula, N. B. : Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium. *Devel. Biol.* 68 : 110–129, 1979.
 - 45) Suzuki, F. and Nagano, T. : Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Devel. Biol.* 63 : 321–334, 1978.
 - 46) Van Blerkom, J., Manes, C. and Daniel, J. C., Jr. : Development of preimplantation rabbit embryos in vivo and in vitro. I. An ultrastructural comparison. *Devel. Biol.* 35 : 262–282, 1973.
 - 47) Staehelin, L. A. : Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39 : 191–283, 1974.
 - 48) Jackson, B. W., Grund, C., Schmid, E., Burki, K., Franke, W. W. and Illmensee, K. : Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeration type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17 : 161–179, 1980.
 - 49) Jackson, B. W., Grund, C., Winter, S., Franke, W. W. and Illmensee, K. : Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* 20 : 203–216, 1981.
 - 50) Lazarides, E. : Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283 : 249–256, 1980.
 - 51) Osborn, M. and Weber, K. : Intermediate filaments : Cell-type-specific markers in differentiation and pathology. *Cell* 31 : 303–306, 1982.

- 52) Sadler, T. W., Greenberg, D., Coughlin, P. and Lessard, J. L. : Actin distribution patterns in the mouse neural tube during neurulation. *Science* 215 : 172-174, 1982.
- 53) Glücksmann, A. : Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26 : 59-86, 1951.
- 54) Silver, J. and Hughes, A. F. W. : The roll of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J. Morph.* 140 : 159-170, 1973.
- 55) Garcia-Porrero, J. A., Collado, J. and Ojeda, J. L. : Cell death during detachment of the lens rudiments from ectoderm in the chick embryo. *Anat. Rec.* 193 : 791-804, 1979.
- 56) Schlüter, G. : Ultrastructural observation on cell necrosis during formation of the neural tube in mouse embryos. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 141 : 251-264, 1973.
- 57) Greene, R. M. and Pratt, R. M. : Developmental aspects of secondary palate formation. *J. Embryol. exp. Morph.* 36 : 225-245, 1976.

付図説明

- 図1 各胎齢における同腹仔ごとのマウス胎仔の尾体節数
●は胎仔一匹。ひとかたまりが同腹仔。たとえば胎齢11日7時間(11/7)の胎仔では上の母獣から得た胎仔は, T. S. 16と17が2匹ずつ, T. S. 18と19が4匹ずつ, T. S. 20と23が1匹の計14匹であった。11/7の下胎仔とはT. S. の分布が大きく異なる。妊娠マウス総数47匹。胎仔総数 583 匹
- 図2 実体顕微鏡写真のトレースに基づく T. S. 12, 13 胎仔のスケッチ
a : 胎仔の全体像。bar は 1 mm
b : 頭部の側面像。組織観察にはおもに内側鼻突起(M), 外側鼻突起(L)を基本にして前方-後方(A-P)平面に平行に, 下方(I)から上方(S)にむかう連続な frontal 切片と, これに垂直で I-S 平面に平行な coronal 切片を用いた。Mx : 上顎突起, MN : 下顎突起, bar は 1 mm
c : 顔面を正面下方からみた像。M : 内側鼻突起, L : 外側鼻突起, Is : Isthmus, bar は 1 mm
- 図3 パラフィン連続切片および $1\mu\text{m}$ 切片からの再構築により明らかとなった鼻窩の Sagital 方向の断面図
図2 b 部と同方向に鼻窩を中心に拡大したもの。b~d では a に示した内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の両鼻突起の突出を省略し, 鼻窩の開口部を — で示し, 鼻窩の Sagital 方向の投影図を……で示した。■■■■は両鼻突起の癒合の先端の接触部をつないだ線を示した。この線に沿って接触に関与すると思われる特殊な最表層上皮細胞が存在している。a : T. S. 6, 7, 表2の Oblong ステージ, b : T. S. 10, 11, c : T. S. 12, 13, d : T. S. 18, 19。b~d は表2の Fusion ステージであり, 癒合の進行とともに突起の成長と鼻窩の陥入が進んでいるので, 内外両鼻突起の癒合は Isthmus(Is*)を原点として考えると, 後上方から前下方(→)に向って進み, 鼻窩の開口部は小さくなっていく。c の 1~5 の位置の切片は後出の図とつぎのように対応する。1 : 図5, 2 : 図6, 7, 3 : 図8, 4 : 図9, 5 : 図10, O. M. : 口鼻膜, S : 上方, I : 下方, A : 前方, P : 後方
- 図4 a~c : 胎仔顔面のステレオ実体顕微鏡像, 正面下方からみた像, bar は 0.5mm
a : T. S. 6, 7。表2の Oblong ステージ。鼻窩の後方端は比較的深い切れ込みとしてみえている(↑)
b : T. S. 10, 11。表2の Fusion ステージ。両鼻突起の癒合部は浅い溝としてみえている(↑)
c : T. S. 12, 13。表2の Fusion ステージ。両鼻突起の成長と頭部の成長がめざましい。両鼻突起の癒合部は浅い溝としてみえている(↑)
d : T. S. 18, 19 胎仔顔面のステレオ走査電子顕微鏡像。正面下方からみた像。この T. S. になると実体顕微鏡では突起の凹凸がみえにくくなるが, 走査電子顕微鏡では詳細をとらえることができる。bar は 0.5mm
- 図5~9 T. S. 12, 13。frontal $1\mu\text{m}$ 連続切片の一部。図5の a~e は左図の□ a~e 部分の拡大を示し, 図6~9 では左図の□部分の拡大を右図に示す。図5~8 の上皮には dense particles が顕著。M : 内側鼻突起, L : 外側鼻突起, Mx : 上顎突起。左図の bar は $200\mu\text{m}$, 図5 a~e および図6~9 の右図の bar は $50\mu\text{m}$
- 図5 両鼻突起の癒合予定部。図3 c-1 の位置
a : 突起先端付近に位置する, 外周上皮と鼻窩内上皮の移行部。上皮配列は乱れ大小の dense particles を持った細胞が大半を占めている
b : 内側鼻突起外周の上皮。1~2 層の扁平な上皮

- c : 外側鼻突起外周の上皮。2～3 層の扁平な上皮
 d : 鼻窩内の内側鼻突起の上皮。多列円柱上皮で表層付近に分裂像(↑)がみられる
 e : 鼻窩内の外側鼻突起の上皮。d ほど背の高くない多列円柱上皮であり、表層付近に分裂像(↑)がみられる

図 6 両鼻突起の接触部。図 3 c-2 の位置

外周上皮と鼻窩内上皮の移行部は 3～5 層の配列が乱れた上皮で、内側鼻突起は、核が Toluidine Blue 濃染で長楕円体または角張った形の基底層の細胞と、それより明るく表面に平行な方向に核の並んでいる表層の細胞が区別される。外側鼻突起は基底層と表層の細胞はほとんど区別がなく、明調な細胞でやや丸みをおびた核を持つ細胞に被われている。両鼻突起の間に核、細胞質ともに明るく大きな細胞(→)がいくつか、あたかも両鼻突起の最表層からとび出しているように存在していた。そのなかで外側鼻突起表層に接触して、1 つにみえる大きな細胞は、右の核がみえている細胞と隣の核のみえていない細胞からなっている

図 7 両鼻突起の接触部。図 6 にすぐ隣接する切片

両鼻突起の間に両鼻突起をつないでいる細胞(→)がいくつか存在している

図 8 両鼻突起の上皮が接着し、上皮壁が作られている。図 3 c-3 の位置

上皮壁の上皮は大小の dense particles を持った細胞が大半を占め、内側鼻突起側は明瞭な基底膜によって周囲の間葉組織と境されているが、外側鼻突起側は基底膜の連続が不明瞭になっており、すぐ隣接した間葉組織内に大小の dense particles を持った細胞が集まっている(►)。上皮壁の鼻腔側端には表層からとび出したような明るい細胞(→)が両鼻突起間にみえる

図 9 両鼻突起の間葉組織は交通し、鼻腔側の上皮と口腔側の上皮は完全に分離している。図 3 c-4 の位置
 間葉組織内に大小の dense particles を持った細胞(►)がみえる

図 10 T. S. 12, 13. coronal 1 μ m 切片。内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の接触部。図 3 c-5 の位置

- a : 鼻窩の内側鼻突起中央付近にはヤコブソン器官が発達し(►), 接触している上皮も肥厚している。接触部の最表層上皮細胞は一枚の切片で 5～10 個並んで出現していた(→←)。bar は 200 μ m
 b : a の拡大図。配列方向が周囲の上皮とは異なる不規則な形の核を持った細胞(→)が、両鼻突起をつないでいる。bar は 20 μ m

図 11 T. S. 12, 13. 走査電子顕微鏡像。b は a の一部の拡大図。鼻窩の下方付近の接触部

内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の表面の細胞とは異なった配列をしている細胞(→)が、両鼻突起をつないでいる。これらの細胞は両鼻突起による谷の底の部分に線状に並んでいる。これは図 3 c の ■■■■部の細胞の連続の一部を示している。すでに接触し新しく外表面となっていく部分にはこれらの細胞はなく、浅い溝状になっている(►)。Mx: 上顎突起。a の bar は 50 μ m, b の bar は 10 μ m

図 12 T. S. 8, 9. frontal 1 μ m 連続切片の一部。M: 内側鼻突起, L: 外側鼻突起。bar は 20 μ m

- a : 両鼻突起の接触予定部。両鼻突起上皮の最表層に、明るい核の細胞がとび出したようにみえる(→)。dense particles を持った細胞が多い
 b : 両鼻突起の接触部。両鼻突起の上皮は最表層の明るい大きな細胞(→)でつながれている

図 13 T. S. 14, 15. frontal 1 μ m 連続切片の一部。M: 内側鼻突起, L: 外側鼻突起。bar は 20 μ m

- a : 両鼻突起の接触予定部。外側鼻突起の最表層には核、細胞質ともに大きな細胞が存在している(→)。両鼻突起に dense particles を持った細胞が、図 12 ほど多くないがみられる
 b : 両鼻突起の接触部。両鼻突起の上皮最表層の核、細胞質ともに大きな細胞により、両鼻突起はつながれており、その上皮最表層細胞同士がなめらかにみえる面で接触している(►)

図 14 T. S. 20, 21. frontal 1 μ m 連続切片の一部。M: 内側鼻突起, L: 外側鼻突起。bar は 20 μ m

- a : 両鼻突起の接触部。両鼻突起の上皮は Toluidine Blue 濃染の基底層の細胞と、明るく表面に平行な方向に核の並んでいる表層の細胞に分化している。両鼻突起は核、細胞質ともに明るく大きな細胞(→)でつながれており、そのなかには dense particles を多数持つ細胞(►)もある。両鼻突起の外周と鼻窩内上皮の移行部には dense particles を持つ細胞はほとんど存在していない
 b : 両鼻突起の接触部。a よりやや上方の切片。a でみられた両鼻突起をつなぐ明るい大きな細胞が並んでいる(→)が、すでにこのような細胞がみえなくなり基底層の細胞によりつながっている部分もある

図 15 T. S. 8, 9. 表 2 の Fusion ステージ

- a : c に示すような内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の接触部を含む frontal 100 μ m 切片の光学顕微鏡像。□部の拡大を b に示す。N: 鼻腔。bar は 100 μ m

- b : a の 部の微分干渉顕微鏡像。内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の上皮の接着により上皮壁ができていて(→←)。上皮壁内およびそれに隣接した間葉組織内で粒状にみえるものは、光学顕微鏡で観察された dense particles に相当すると思われる。c に示すようにこの切片に垂直に-----D, E 付近で切った切片の電子顕微鏡像を d, e に示す。bar は 100 μ m
- c : 図3と同様の鼻窩の Sagital 方向の断面図 は鼻窩の開口部, は接触部, は突起の突出を示す。frontal 100 μ m 切片に垂直な D, E の位置の切片の電子顕微鏡像を d, e に示す。D の位置の表層上皮はすでに接触し新しく外表面になっていく部分, E の位置の表層上皮は接触部である。Is: Isthmus. bar は 100 μ m
- d : b, c に示した D の位置の電子顕微鏡像。表層細胞の表面付近は細胞間隙が非常に狭く、その部の細胞膜には繊維がかなり集合していた。表面には細突起もみられる。bar は 10 μ m
- e : b, c に示した E の位置の電子顕微鏡写真のモンタージュ。接触前に両鼻突起の上皮最表層であったと思われる細胞群(→)が、介在するようにして両鼻突起をつないでおり、これらの細胞はその下層の上皮細胞とは配列が異なり区別される。bar は 10 μ m

図16 T. S. 8, 9. 表2の Fusion ステージ。両鼻突起の接触部を含む frontal 150 μ m 切片を垂直に切った切片

- a : 内外両鼻突起の接触部の先端付近、先端にある両鼻突起からとび出しているようにみえる上皮最表層細胞(*)が両鼻突起をつないでいる。bはこの切片に隣接した切片で、この最表層の細胞が隣接細胞と接触していない面が広く、周辺の細胞からとび出していることがよくわかる。両鼻突起の上皮最表層細胞の表面近くには、繊維の束が表面に平行な方向に走っており(→)、数個の細胞にわたっているように見え、それはすでに接着した部分の上皮細胞中にも連続して認められる(▶)。接触部の先端付近の拡大をcに、すでに接着した部の拡大をdに示す。bar は 10 μ m
- b : a に隣接した切片。両鼻突起の接触部の先端には隣接細胞とあまり接触面の広くない細胞(*)がみられる。bar は 10 μ m
- c : a の接触部の先端付近。接触予定部の両鼻突起の上皮最表層細胞の表面付近には繊維の束(→)が走っており、両鼻突起をつないでいる先端の細胞(*)と、接触している部分の繊維の束ももとのままの表面に平方な方向に走っている。*の細胞内にも繊維がみられる(▶)。bar は 1 μ m
- d : a のすでに接着した部分。繊維の束(▶)はcで示した接触予定部の上皮最表層細胞の表面近くを走っていたものから、あたかも続いているように追うことができ、この繊維の束を持つ細胞が、かつて接触前には上皮最表層細胞であり、この細胞の表面で両鼻突起の接触がおこり、接着後も繊維の束の配列はそのまま残っていると考えられる。bar は 1 μ m

図17 T. S. 12, 13. frontal 切片による両鼻突起の接触部。これは 図15 e, 16 の接触部の先端の細胞をこれらに垂直な方向に切ったときの電子顕微鏡像に相当する

- a : 内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の間に1個の細胞がみられ、両鼻突起をつないでいる。N : 鼻腔。bar は 10 μ m
- b : a で示した両鼻突起をつないでいる細胞の拡大図。この両鼻突起をつないでいる細胞の細胞質内には、ミトコンドリア、ゴルジ装置、rER、ポリゾームがみられる。この細胞と両鼻突起の上皮との隣接面にはどちらの突起側にもタイト結合様の構造、接着小帯、ギャップ結合、デスモゾームがみられた。外側鼻突起側の隣接面をdに、内側鼻突起側の隣接面のc部の隣接切片をcに示す。bar は 10 μ m
- c : b に示した部の隣接切片像。よく発達したデスモゾームのすぐ下の接着装置は、それより細胞膜の間隔はやや広く、一方の細胞質側にだけ電子密度の高い無定形の薄層の分化と、そこに終わる多数の張原繊維がみられ、膜間には電子密度の高い物質の分化もみられるが、もう一方の膜側の細胞膜下にわずかに高い電子密度がみられるのみであり、非対称なデスモゾーム様構造をしている。しかし前後の切片を観察していないので、デスモゾームの縁を斜めに切っている可能性もある。bar は 0.1 μ m
- d : b に示した両鼻突起をつなぐ細胞の外側鼻突起側の隣接面。4つのおもな J. C. の発達がみられる。隣接細胞膜からやや離れた場所にみられる intermediate filaments (▶)と、細胞膜直下のそれよりやや細い繊維(→)が観察される。coated pit または coated vesicle (↑)がみられる。e に J. C. の拡大を示す。bar は 1 μ m
- e : d に示した部の拡大。電子密度の高い裏打ちを持った接着小帯(I)、ギャップ結合(G)、よく発達したデスモゾーム(D)がみえる。bar は 0.1 μ m

図18 T. S. 20, 21. frontal 切片による両鼻突起の接触部

- a : 内側鼻突起(M)と外側鼻突起(L)の最表層上皮細胞間の接触部。bに拡大を示す。bar は 1 μ m

- b : a に示した両鼻突起の最表層上皮細胞間のデスモゾーム様構造。両方の細胞膜をはさんで電子密度の高い裏打ち構造が数個並んでいるが、それらは左右非対称である。右端に張原繊維が斜めに終わっている通常のデスモゾームがみられる。bar は $1\mu\text{m}$

2

T. S. 12, 13

a

b

c

3

T. S. 6, 7

a

10, 11

b

12, 13

c

18, 19

d