

マウス内耳発生における TUNEL 陽性死細胞の形態学的 観察 (第二報) — 微細構造による細胞死分類について —

平井 滋夫

胎生期マウスの内耳に出現する死細胞には TdT-mediated dUTP nick end-labeling (以下 TUNEL) 光顕レベルでアポトーシス細胞死 (ACD) と非アポトーシス細胞死 (NACD) を示すものが存在し、内耳全体の総死細胞数に対して前者は約90%、後者は約10%発現する。cis-diammine-dichloroplatinum (以下 CDDP) 負荷によって、総死細胞数に著変なく ACD が約70%、NACD が約30%となり、NACD を示す死細胞の発現が増加することを見出し、前報に報告した (川崎医学会誌 28(4) : 287-296, 2002)。本研究の目的は光顕的に TUNEL 陽性死細胞が確認された切片を再包埋して電顕観察し、胎生期マウス内耳における ACD, NACD についてその超微形態的特徴を明らかにすることである。続いて内耳全体を可及的に電顕観察することによって ACD, NACD を示す死細胞に対する貪食処理様式、核正常であるため TUNEL 法で検出不可能な死細胞存在の有無についても検討した。これらの結果から、ACD を示す死細胞は Clarke の分類による type 1 死細胞すなわちアポトーシスによる死細胞であり、NACD を示す死細胞は type 2 死細胞すなわち自己貪食による死細胞で、さらに type 1 死細胞は隣接細胞に貪食処理されていた。また、これらは CDDP 負荷によっても変化しないことが明らかとなった。 (平成14年10月28日受理)

A Morphological Study of TUNEL Positive Dying Cells in the Developing Inner Ear of Mouse Embryos (the second report) — Ultrastructural Classification —

Shigeo HIRAI

TdT-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) positive dying cells in the inner ears of embryonic mice could be classified as involved in apoptotic cell death (ACD) and non-apoptotic cell death (NACD) by light microscopy. Approximately 90% of the inner ear dying cells were in ACD and remaining 10% were in NACD. Cis-diammine-dichloroplatinum (CDDP) decreased the ACD/NACD ratio as 70/30 without clear change in the number of total dying cells (Kawasaki Igakkai Shi 28(4) : 287-296, 2002). After observations under light microscope, using re-embedding maneuver, the same TUNEL positive dying cells were observed by transmission electron microscopy (TEM). According to the classification of dying cells by Clarke (1990), the TUNEL positive dying cell's images were analyzed. The phagocytosis of dying cells and TUNEL negative dying cells in the inner ears were observed by ordinary TEM. The results clearly showed

that ACD involved in type 1 (apoptotic) dying cells and NACD involved in type 2 (autophagic) dying cells in the inner ear of the mouse embryos, and that the type 1 dying cells were engulfed by neighboring cells. These images were not changed by the administration of CDDP. (Accepted on October 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 29(1):17-29, 2003

Key Words ① Apoptosis ② Inner ear ③ Mouse embryo
④ TUNEL method ⑤ Transmission electron microscopy

はじめに

今日、個体発生にともなう“自然細胞死”では、アポトーシス^{1)~3)}以外の異なる細胞死のプロセスが存在するといわれている⁴⁾。第一報⁵⁾では *in vivo* での生理的な“自然細胞死”の形態と発現頻度および内耳毒性に対する反応を明らかにするために、胎生期マウスの内耳全体を対象にパラフィン連続切片を作製し、TdT-mediated dUTP nick end-labeling (以下 TUNEL) 法⁶⁾によって細胞死の光学顕微鏡 (以下光顕) 観察を行った。光顕的に観察された TUNEL 陽性細胞を死細胞としてアポトーシスの定義^{1)~4)}に基づいて分析を行い、正常核と比較して明らかな核濃縮を呈し核がほぼ正円形で、核辺縁に沿うように三日月状あるいはリング状に濃染しているものをクロマチンの辺縁化像と判断しアポトーシス細胞死 (以下 ACD) と定義した。また、核染色陽性であり核濃縮を呈するが、核が正円形を呈さず変形し、核辺縁に濃染部を認めないものを非アポトーシス細胞死 (以下 NACD) と定義した。内耳全体の連続切片で ACD, NACD を示す死細胞をカウントし統計学的に検討した結果、同対象における総死細胞のうち、約90%は ACD を示すものであり、約10%は NACD を示すものであることが明らかとなった。また内耳毒性を有する *cis*-diammine-dichloroplatinum (以下 CDDP) を負荷することによって、総死細胞数を著変させることなく ACD を示す死細胞が約70%、NACD を示す死細胞が約30%と死細胞発現率に変化が生じることも判明した。しかし細胞死の判定は光顕観察のみでは不十分であるため、さらに透過型電子

顕微鏡 (以下電顕) による詳細な観察が必要であり、また胎生期内耳における死細胞に対する貪食処理プロセスの解明も必要であった。

本研究では、胎生期内耳における ACD, NACD を示す死細胞の電顕的微細構造とそれらに対する貪食処理様式およびその他の死細胞存在の有無を明らかにすることを目的とする。特に、TUNEL 陽性死細胞のエポキシ樹脂再包埋による同一死細胞の TUNEL 光顕像と電顕像の比較観察 (以下 Epon-TUNEL 光顕・電顕観察) を行い、Clarke⁴⁾ が報告した発生期細胞死の電顕分類 (type 1, 2, 3A, 3B) に基づいて分析した。

材料と方法

動物は ICR マウス胎生12日目、1) Epon-TUNEL 光顕・電顕観察で対照群 5 匹10耳、CDDP 群 5 匹10耳、2) 電顕観察で対照群 5 匹10耳、CDDP 群 5 匹10耳であった。妊娠が確認された ICR マウス (チャールス・リバー社) を恒常的条件下 (22±2℃) で固形飼料 (オリエンタル酵母工業, NMF) と自由飲水で飼育した。CDDP 群の母体には妊娠 4 日目から 7 日目まで CDDP (プリプラチン[®], プリストル社) を 2.0 mg/kg/day で腹腔内投与し、対照群の母体には同時期に CDDP 群投与量と同量の生理食塩水を腹腔内投与した。なお CDDP 投与濃度については、第一報⁵⁾ と同様に流産や奇形が無く、対照群と比較して胎児の数と大きさに著変の無いもので最高濃度 2.0 mg/kg/day を使用した (詳細は第一報⁵⁾ に記載)。両群ともに妊娠12日目に母体をクロロホルムにて深麻酔後開腹し、摘出した胎生期マウスを断頭後、以下の

方法で処理して内耳における ACD, NACD を示す死細胞とそれらに対する貪食処理様式およびその他の死細胞存在の有無について観察を行った。

1) Epon-TUNEL 光顕・電顕観察（対照群 N = 10耳, CDDP 群 N = 10耳）

内耳を含む側頭部を約 2 mm² の直方体にトリミングし 2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液 (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) にて 2 時間 4℃ で前固定した。次いで 1%四酸化オスミウムにて 2 時間 4℃ で後固定し、アルコール系列にて脱水後エポキシ樹脂 (Epon 812 : 25.3 g, DDSA : 11.1 g, MNA : 13.6 g, DMP 30 : 0.9 g) で包埋した。それらを準超薄切片 (1 μm) とし、飽和過ヨウ素酸ナトリウムにて 20 分間 37℃ で樹脂切片表面のエッチング処置後、リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS, pH 7.4) で 4 回洗浄し、TUNEL 反応液 (In Situ Cell Detection Kit POD, Roshe Diagnostics 社) 中で 60 分間 37℃ で反応させた。その後 PBS で 4 回洗浄後、コンバーター POD 液 (ペルオキシダーゼ標識羊由来抗フルオレセイン抗体, Fab フラグメント) 中で 30 分間 37℃ で反応させ、PBS で 4 回洗浄後、3, 3'-ジアミノベンチジン溶液 (シンプルステイン DAB 溶液, 株式会社ニチレイ) で 60 分間発色させ光顕的に観察を行った。TUNEL 染色の陰性対照標本では TUNEL 反応液の代わりにターミナルトランスフェラーゼを含まない標識液で処理し、標本が染色されないことを確認した。TUNEL 陽性死細胞の光顕観察にて ACD と NACD を判定後、プレパラート上の準超薄切片をエポキシ樹脂を注入したゼラチンカプセルで被い、6 時間 60℃ にて再包埋した。そのエポキシブロックをトリミングし同切片部位の面合わせを十分に行い、ウルトラミクロトームで超薄切片 (80 nm) を作製し、2%酢酸ウランメタノール溶解液で 20 分間染色後、蒸留水 150 ml で洗浄した。続いてクエン酸鉛液で 5 分間染色後、蒸留水 250 ml で洗浄し JEM-2000 EX (日本電子社) で 80

kV にて ACD, NACD を示す死細胞の電顕像を観察した。以上により得られた胎生期マウス内耳の同一死細胞の TUNEL 光顕像と電顕像を Clarke⁴⁾ の発生期細胞死の電顕分類 (type 1, 2, 3A, 3B) に基づいて分析し、Epon-TUNEL 光顕像で得られる ACD, NACD は電顕的にはいずれの細胞死タイプに相当するかを確認した。なお Epon-TUNEL 光顕観察での TUNEL 陽性死細胞と同一死細胞を電顕像上で確定するために、あらかじめコンピュータに保存しておいた Epon-TUNEL 光顕像を反転・回転させ、組織像が一致することを確認して ACD, NACD を示す死細胞の電顕観察を行った。

2) 電顕観察 (対照群 N = 10耳, CDDP 群 N = 10耳)

方法 1) と同じ手順で対象をエポキシ樹脂包埋してウルトラミクロトームで超薄切片 (80 nm) を作製し、2%酢酸ウランメタノール溶解液で 20 分間染色後、蒸留水 150 ml で洗浄した。続いてクエン酸鉛液で 5 分間染色後、蒸留水 250 ml で洗浄し JEM-2000 EX (日本電子社製) で 80 kV にて ACD, NACD を示す死細胞に対する貪食処理像と核正常であるため TUNEL 法で検出不可能な死細胞存在の有無を電顕的に観察した。

まず本研究の細胞死判定基準とした Clarke⁴⁾ の分類による死細胞の特徴 (Table 1) をまとめると、type 1 死細胞はアポトーシス^{1)~3)}, shrinkage necrosis^{7), 8)}, precocious pycnosis⁹⁾, nuclear type of cell death¹⁰⁾ を来したものであり、クロマチンの凝集・辺縁化によって顕著な核濃縮を呈する。さらに細胞質自体縮小して早期に貪食される。type 2 死細胞は autophagic cell death^{11)~20)} を来したものであり、核濃縮を呈するものと、正常核を有するものが存在するがクロマチンの凝集・辺縁化は見られず核内容が小囊化し細胞質内に分離していく。細胞質では多量の自己貪食空胞を認め細胞内小器官は膨張し、死滅速度が遅く晩期に貪食され組織残存傾向が強い。type 3A 死細胞は non-lysosomal dis-

Table 1. Summary of the four types of cell death according to Clarke's report. The most striking and reliable characteristics of each types are shown.

	Various designations	Nucleus	Cell membrane	Cytoplasm	Heterophagic elimination
Type1	Apoptosis; shrinkage necrosis; precocious pycnosis; nuclear type of cell death	Nuclear condensation, clumping of chromatin leading to pronounced pycnosis	Convuluted, forming blebs	Loss of ribosomes from RER and from polysomes; cytoplasm reduced in volume becoming electron-dense	Prominent and important
Type2	Autophagic cell death	Pyknosis in some cases. Parts of nucleus may bleb or segregate	Endocytosis at least in some cases; blebbing can occur	Abundant autophagic vacuoles; ER and mitochondria sometimes dilated; Golgi often enlarged	Occasional and late
Type3A	Non-lysosomal disintegration	Late vacuolization, then disintegration	Breaks	General disintegration; dilation of organelles, forming "empty" spaces that fuse with each other and with the extracellular space	No
Type3B	Cytoplasmic type	Late increase in granularity of chromatin	Rounding up of cell	Dilation of ER, nuclear envelope, Golgi and sometimes mitochondria, forming "empty" spaces	Yes

integration^{4),14)}を来したものであり、晩期に核空胞化を認めクロマチンの凝集・辺縁化は無く崩壊する。細胞質も全般的に壊れ、細胞内小器官は膨張するが、貪食は認められず組織残存傾向が強い。type 3B 死細胞は cytoplasmic type of cell death^{4),10),21),22)}を来したものであり、核では晩期に粒状化クロマチンの増加を認めその凝集・辺縁化は見られない。細胞膜は球形となり細胞内小器官は膨張し、晩期に貪食され組織残存傾向が強い。なお細胞死は時間とともに変化していくため、これらの死細胞の電顕の特徴はすべてが同時に確認されるものではないとされている⁴⁾。以上の各死細胞の特徴を基に、胎生期マウスの内耳における ACD, NACD を示す死細胞を観察した。

本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 02-063), 川崎医科大学動物指針に基づいて実施された。

成 績

1) Epon-TUNEL 光顕・電顕観察 (対照群 N = 10耳, CDDP 群 N = 10耳)

Epon-TUNEL 光顕像は第一報⁵⁾で示したパ

ラフィン切片による TUNEL 光顕像 (以下 Paraffin-TUNEL 光顕像) と比較すると、核の染色性は低下するが陽性・陰性の鑑別は十分可能であった。Clarke⁴⁾の分類による死細胞の特徴は次のようにいくつか見出された。Figure 1 は対照群例であり、a の Epon-TUNEL 光顕像ではリング状に核辺縁部が濃染し、核辺縁の形状もほぼ正円形で ACD を示す死細胞と判定され、その電顕像 (Fig. 1b, c) では核濃縮を呈し核辺縁に三日月状に凝集・辺縁化したクロマチン (黒矢頭) の存在が明らかであり、細胞質 (白矢頭) も狭小化を示し type 1 死細胞と断定された。Figure 2 は CDDP 群例であるが Figure 1 と同様 a の Epon-TUNEL 光顕像で ACD を示す死細胞と判定され、その電顕像 (Fig. 2b, c) で type 1 死細胞と断定された。この死細胞の細胞膜は消失し隣接細胞の細胞質 (白矢頭) 内に完全に取込まれていた。これらの像は対照群 10 耳, CDDP 群 10 耳すべてにおいて高頻度に観察され、Epon-TUNEL 光顕観察で得られる ACD を示す死細胞は type 1 死細胞と断定出来ることが明らかとなった。Figure 3 は対照群例であるが a で示す Epon-TUNEL 光顕像では核濃縮を呈するが、核は変形し核辺縁に濃染部を認め

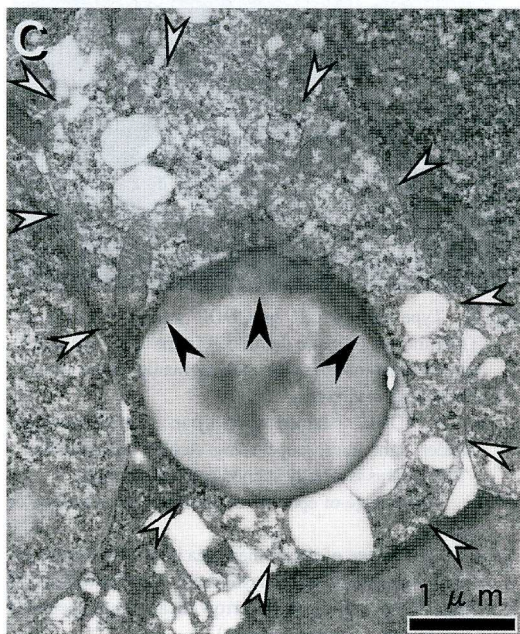
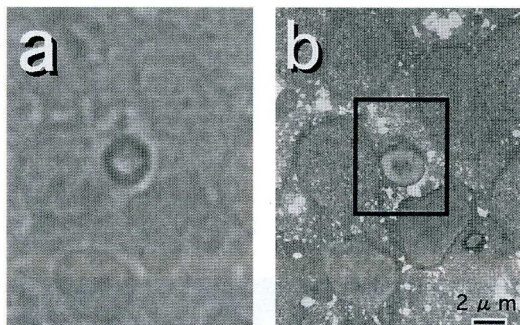


Fig. 1. Type 1 dying cell in Control group. TUNEL & TEM images of same dying cell in the inner ear of 12-day-embryo mouse using etching manipulation and re-embedding maneuvers.

a. A TUNEL stained epon $1\mu\text{m}$ section observed under light microscope using etching manipulation.

The nucleus has virtually complete round and strong staining area at the nuclear rim.

b. TEM image of epon re-embedding 80 nm section of **a**.

c. TEM image of the framed area in **b**. The chromatin of this dying cell is clumped and has accumulated mainly at the nuclear rim (black arrow heads). The cytoplasm of this dying cell is narrow (white arrow heads).

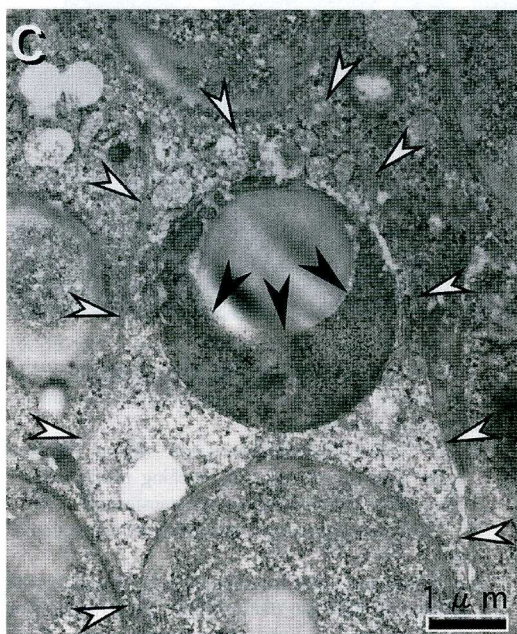
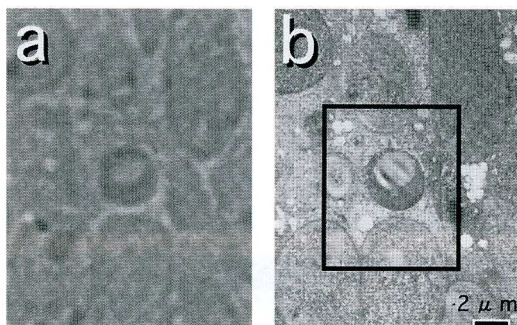


Fig. 2. Type 1 dying cell in CDDP group. TUNEL & TEM images of same dying cell in the inner ear of 12-day-embryo mouse using etching manipulation and re-embedding maneuvers.

a. A TUNEL stained epon $1\mu\text{m}$ section observed under light microscope using etching manipulation.

The nucleus has virtually complete round and strong staining area at the nuclear rim.

b. TEM image of epon re-embedding 80 nm section of **a**.

c. TEM image of the framed area in **b**. The chromatin of this dying cell is clumped and has accumulated mainly at the nuclear rim (black arrow heads). This dying cell has no cytoplasm and is phagocytosed by a neighboring cell (white arrow heads).

ないものであり NACD を示す死細胞と判定され、その電顕像 (**Fig. 3b, c**) では豊富な細胞質 (矢頭) が明らかであり、その中に自己食胞と思われる電子密度の高い領域 (矢印) を

認めた。また核濃縮を呈するが、核は変形シクロマチンの凝集・辺縁化は存在せず type 2 死細胞と断定された。 **Figure 4** は CDDP 群例であるが **Figure 3** と同様 a の Epon-TUNEL 光顕像

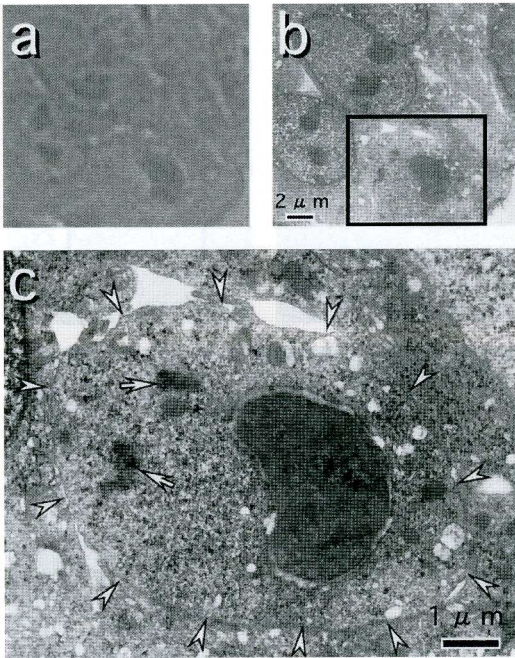


Fig. 3. Type 2 dying cell in Control group. TUNEL & TEM images of same dying cell in the inner ear of 12-day-embryo mouse using etching manipulation and re-embedding maneuvers.

- a. A TUNEL stained epon $1\mu\text{m}$ section observed under light microscope using etching manipulation. The nucleus is wholly stained and transformed.
- b. TEM image of epon re-embedding 80 nm section of a.
- c. TEM image of the framed area in b. The nucleus is abnormally dark and transformed. The cytoplasm of this dying cell is rich (arrow heads) and contains autophagic vacuoles (arrows).

で NACD を示す死細胞と判定され、その電顕像 (Fig. 4b, c) で type 2 死細胞と断定された。これらの像は type 1 死細胞と比較して低頻度であったが対照群10耳、CDDP 群10耳すべてにおいて観察され、Epon-TUNEL 光顕観察で得られる NACD を示す死細胞は type 2 死細胞と断定出来ることが明らかとなった。一方、Epon-TUNEL 光顕像では対照群10耳、CDDP 群10耳すべてにおいて type 3A, 3B の特徴を有する TUNEL 陽性死細胞は認められなかった。本研究の Epon-TUNEL 光顕観察で得られた ACD, NACD を示す死細胞は染色濃度が低いものの、第一報⁵⁾ で示した Paraffin-TUNEL 光顕観察による ACD, NACD の定義に忠実にしたがって

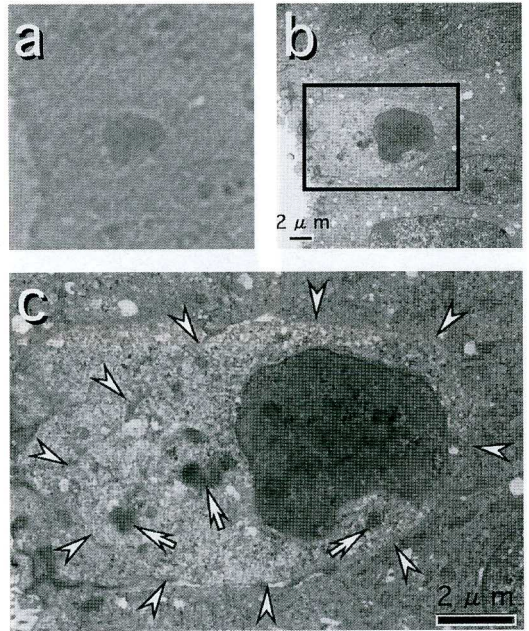


Fig. 4. Type 2 dying cell in CDDP group. TUNEL & TEM images of same dying cell in the inner ear of 12-day-embryo mouse using etching manipulation and re-embedding maneuvers.

- a. A TUNEL stained epon $1\mu\text{m}$ section observed under light microscope using etching manipulation. The nucleus is wholly stained and transformed.
- b. TEM image of epon re-embedding 80 nm section of a.
- c. TEM image of the framed area in b. The nucleus is abnormally dark and transformed. The cytoplasm of this dying cell is rich (arrow heads) and contains autophagic vacuoles (arrows).

判定した為、同種の死細胞を判定したものと考えられた。

2) 電顕観察 (対照群 N = 10耳, CDDP 群 N = 10耳)

内耳全体を可及的に観察したところ、対照群10耳、CDDP 群10耳すべてにおいて結果 1) と同様に死細胞の大多数は type 1 死細胞であった。Figure 5 に対照群例を示すが、a は type 1 死細胞が隣接細胞内 (矢頭) に取込まれた像であり、b は隣接細胞内 (矢頭) で type 1 死細胞が物理的に断片化しアポトーシス小体となり貪食処理が進行した融解像と思われた。Figure 6 に CDDP 群例を示すが、a は Figure 5 と同様

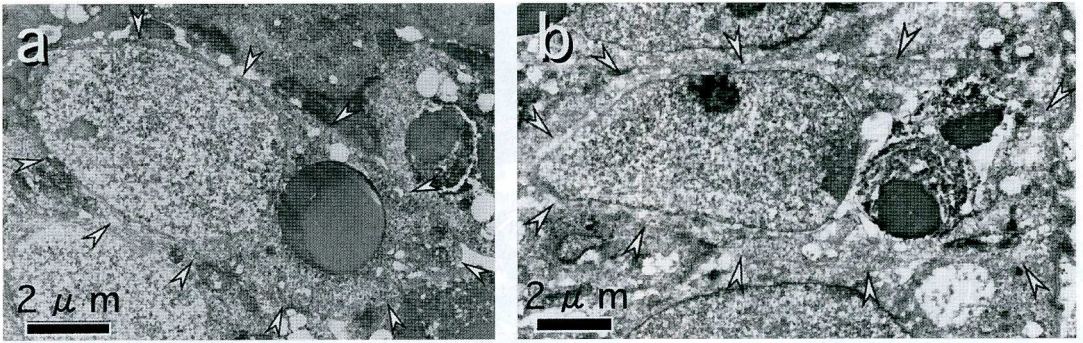


Fig. 5. TEM images of type 1 dying cells in Control group of the inner ear of 12-day-embryo mouse. The cytoplasm of neighboring cells are shown by arrow heads.

- a. Type 1 dying cell is engulfed by a neighboring cell.
- b. Apoptotic bodies fragmented from type 1 dying cell are engulfed by a neighboring cell.

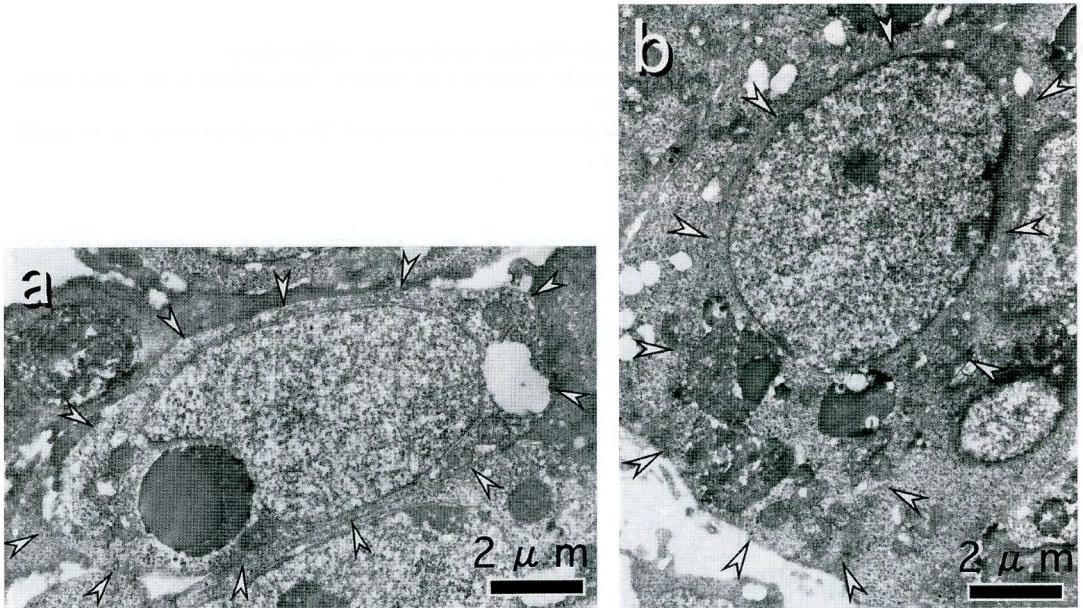


Fig. 6. TEM images of type 1 dying cells in CDDP group of the inner ear of 12-day-embryo mouse. The cytoplasm of neighboring cells are shown by arrow heads.

- a. Type 1 dying cell is engulfed by a neighboring cell.
- b. Apoptotic bodies fragmented from type 1 dying cell are engulfed by a neighboring cell.

type 1 死細胞が隣接細胞内（矢頭）に取込まれた像であり、**b**も隣接細胞内（矢頭）で type 1 死細胞に対する貪食処理が進行した融解像と考えられた。隣接細胞に取込まれていないものも稀に存在したが、そのほとんどは取込みがなされており、対照群10耳、CDDP群10耳すべてにおいて同様であった。したがって、隣接細胞が type 1 死細胞の貪食処理を行っており、マクロ

ファージの関与は少ないと考えられた。また結果1)と同様に対照群10耳、CDDP群10耳すべてにおいて低頻度ではあるが type 2 死細胞の存在が確認された。**Figure 7**に対照群例を示すが、**a, b**ともに細胞質（矢頭）が豊富で自己貪食空胞と思われる電子密度の高い領域（矢印）が存在し、核クロマチンの辺縁化は認められないため type 2 死細胞と断定され、**a**には核濃縮

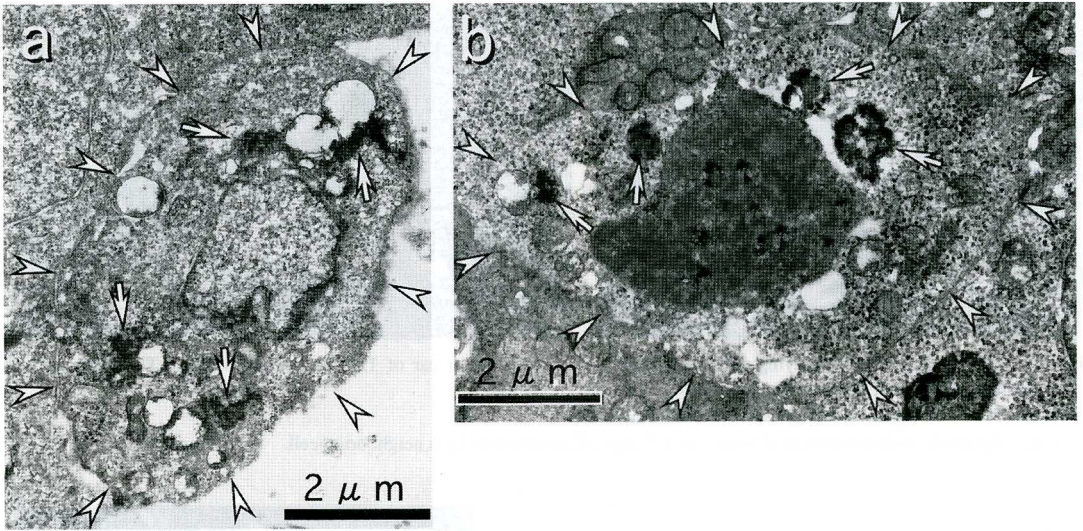


Fig. 7. TEM images of type 2 dying cells in Control group of the inner ear of 12-day-embryo mouse.

- a. The nucleus changes shape being not pyknotic, and the chromatin is not clumped. The cytoplasm is rich (arrow heads), containing numerous autophagic vacuoles (arrows).
- b. The nucleus changes shape being pyknotic, and the chromatin is not clumped. The cytoplasm is rich (arrow heads), containing numerous autophagic vacuoles (arrows).

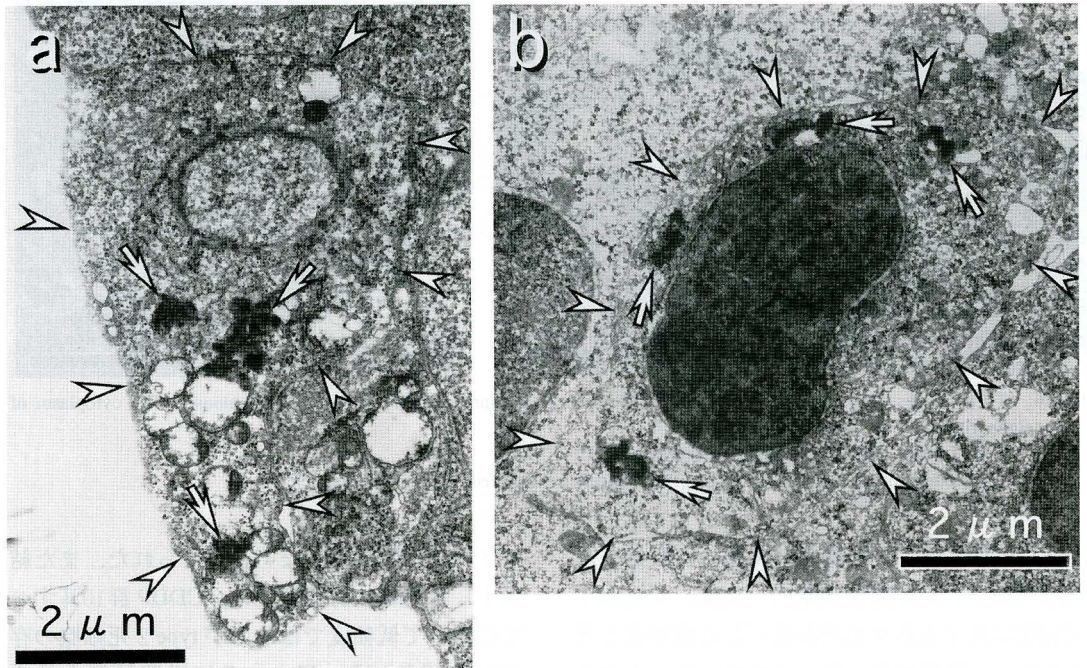


Fig. 8. TEM images of type 2 dying cells in CDDP group of the inner ear of 12-day-embryo mouse.

- a. The nucleus is not pyknotic and the chromatin is not clumped. The cytoplasm is rich (arrow heads), containing numerous autophagic vacuoles (arrows).
- b. The nucleus changes shape being pyknotic, and the chromatin is not clumped. The cytoplasm is rich (arrow heads), containing numerous autophagic vacuoles (arrows).

が無く **b** には存在した。Figure 8 には CDDP 群例を示すが Figure 7 と同様に細胞質（矢頭）が豊富で自己貪食空胞（矢印）が明らかであり type 2 死細胞と断定され、**a** には核濃縮が無く **b** には存在した。これら核濃縮の有無はいずれも type 2 死細胞の定義⁴⁾ に含有されており、結果 1) で観察不可能であった核濃縮を認めない、すなわち TUNEL 陰性となる type 2 死細胞の存在も証明された。しかし type 2 死細胞に対する明らかな貪食処理様式は対照群 10 耳、CDDP 群 10 耳すべてにおいて確認出来なかった。また type 3A, 3B 死細胞も結果 1) と同様に対照群 10 耳、CDDP 群 10 耳すべてにおいてその存在は確認されなかった。

考 察

DAB を用いた免疫染色は、まず検体に存在する抗原に対する一次抗体を抗原抗体反応させ、次にペルオキシダーゼを標識した一次抗体に対する抗体（二次抗体）を抗原抗体反応で結合させ、さらにペルオキシダーゼを DAB で発色させる原理である。つまり検体に存在する抗原性が強くないと検出困難となるため、検体の固定液は形態よりも抗原性が保存されるものを使用する必要がある。一方、本研究で用いた In Situ Cell Detection Kit POD による TUNEL 法⁶⁾ の原理は酵素 TdT によって DNA 断端にフルオレセイン標識 dUTP を結合させる。次にペルオキシダーゼを標識した抗フルオレセイン抗体を抗原抗体反応で結合させ、さらにペルオキシダーゼを DAB で発色させるものである。したがって、理論上 TUNEL 法⁶⁾ では検体の抗原性が減弱しても DNA 断端の形態が保存されていれば検出は可能と考えられる。実際に Epon-TUNEL 光顕・電顕観察の固定液の濃度を決定するにあたり、形態保存は良好であるが抗原性を低下させるグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムを低濃度（前者 0.1~1%, 後者 0.1~0.5%）にした場合 Epon-TUNEL 光顕像では TUNEL 陽性・陰性はむしろ確定困難なものが多く、同電

顕像は当然のことながら不明瞭であり、細胞質の詳細な観察は不可能であった。一方、本研究で用いた 2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液と 1%四酸化オスミウム液で固定したものでは Epon-TUNEL 光顕像で TUNEL 陽性・陰性は十分確定可能であり、電顕像も細胞質が十分観察できるレベルであった。

本研究の Epon-TUNEL 光顕観察で得られた ACD, NACD を示す死細胞は、それぞれ type 1, type 2 死細胞と断定出来る。また、第一報⁵⁾ における ACD, NACD を示す死細胞の Paraffin-TUNEL 光顕観察の特徴を本研究の Epon-TUNEL 光顕観察でも確認した。したがって、第一報⁵⁾ で得られた ACD, NACD を示す死細胞の頻度は、前者が約 90%, 後者が約 10% であり CDDP 負荷によって前者が約 70%, 後者が約 30% に変化することは type 1, type 2 死細胞の頻度とその内耳毒性による変化を表す。ところで、TUNEL 法⁶⁾ では DNA 断片化を来するような核の変性が存在すれば、死細胞の核形態を観察できる。しかし type 3B 死細胞は早期では核クロマチンはゆっくりと粒状化するのみで凝集を示さないし核崩壊も起こらないまま貪食される⁴⁾。その後マクロファージの DNase²³⁾ あるいは隣接細胞内ライソソーム等によってはじめて DNA 断片化が生じ濃縮の無い TUNEL 陽性核として確認される。本研究においては Epon-TUNEL 光顕観察で陽性核として検出できず、また DNA 断片化前の type 3B 死細胞を念頭においた電顕単独観察でもその存在が確認されなかった。また type 3A 死細胞もその過程は遅延するが核の自己空胞化による DNA 断片化が観察されるはずであるが、Epon-TUNEL 光顕観察で検出できず、DNA 断片化前の像も電顕単独観察で検出されなかった。一般的に type 3A 死細胞は発生期ニワトリの軟骨¹⁴⁾、type 3B 死細胞は発生期ニワトリの毛様体神経節¹⁰⁾、腰椎運動ニューロン²¹⁾、滑車神経^{21), 22)} に確認される⁴⁾ のみで、発生期において type 3A, 3B 死細胞は非常に稀な存在とされ、

胎生期マウス内耳における死細胞も type 1 と type 2 死細胞であることが確認出来た。これは胎生期ラット耳包の電顕観察の報告²⁴⁾を Clarke⁴⁾が分析した結果と同様と言えるが、本研究では第一報⁵⁾で得られた ACD, NACD を示す死細胞の頻度と総合して、それらの内 type 1 死細胞が圧倒的に多く、さらに type 1 死細胞は隣接細胞の貪食によって処理されていることを明らかに出来た。一方、マウス内耳全体像を可及的に電顕観察しても type 2 死細胞に対する貪食処理様式を観察出来なかったが、これも一般的に貪食されることが稀で、貪食されても非常に遅い段階で起こる⁴⁾とされる type 2 死細胞の特徴と一致する。

ところで type 1 死細胞の役割は胎生期の生体にとって不要となった細胞を除去し²⁵⁾分裂・増殖と協同して器官形成を担うことであるが、type 2 死細胞の役割は何であろうか。一般的に細胞は DNA 損傷が起こると細胞周期を停止して、その修復時間を得ようとするといわれている^{26), 27)}。type 1 死細胞は短期間で死滅消失するため DNA 修復可能な細胞はほとんど無いと思われたが、type 2 死細胞は消失までに長時間を有する⁴⁾ため、その間に DNA 修復される細胞はある程度存在すると予想された。実際に結果 2) で得られた type 2 死細胞には核濃縮を呈し不可逆的な死があるものと、正常核を有し死が可逆的であるものが存在した事実がそれを支持する。すなわち、Figure 7a, 8a のような核濃縮が認められない type 2 死細胞は DNA が修復され、正常細胞として復帰する過程の像ではないかと考えられた。そこで、CDDP 負荷によって TUNEL 陽性の、すなわち死が決定した総死細胞数を変化させることなく NACD を示す死細胞の発現率を増加させるという第一報⁵⁾の結果を合わせて考えてみると、すでに“自然細胞死”が存在する発生期過程において内耳毒性負荷などの理由で死細胞が過度に出現し形成不全を来してしまうような危機的状態に対して、自身の生死を調節することによって死が決定した総死細胞数を一定に保つことが type 2 死細胞の

役割ではないかと思われた。逆に type 1 死細胞は、その発現率がある程度低下しても器官形成は問題なく実行されることが本研究結果から窺い知ることが出来た。

さて、発生期に認められる“自然細胞死”は分裂・増殖等と同様に遺伝子で制御されると考えられ、以前から“プログラム細胞死”と呼ばれてきた^{28)~30)}。その後、その形態がアポトーシス^{1)~3)}に合致することが判明し両者は同じものと考えられる傾向が強く存在した。第一報⁵⁾と本研究結果でも胎生期マウスの内耳における死細胞として type 1 死細胞が大多数を占めていた。しかし頻度は少ないものの type 2 死細胞も明らかに存在し、その死滅速度に関する特徴から前述のごとく存在意義も予想することができた。つまり胎生期マウスの内耳では type 1, type 2 死細胞両者ともに分裂・増殖等と同様発生期において必須であり、遺伝子で制御された“プログラム細胞死”であることが示された。

現在までにアポトーシス^{1)~3)}の形態学および生化学的変化を一度に確認するために、DNA 断片化を金コロイドで標識して電顕で観察する「電顕 TUNEL 法」³¹⁾が報告されている。その報告ではアポトーシス^{1)~3)}とネクローシスの存在を指摘しているが、熱による“誘導細胞死”を *in vitro* で観察したものであり、“自然細胞死”と同様のことが起こるとは考え難い。それにもかかわらず *in vivo* の“自然細胞死”における TUNEL 陽性死細胞もアポトーシス^{1)~3)}を示すもの以外はネクローシスであると誤認されている傾向が未だに存在すると思われる。しかし本研究結果によって、少なくとも胎生期マウスの内耳における“自然細胞死”でのこれらの不明な点は解決できた。つまり TUNEL 陽性死細胞の中で、アポトーシス^{1)~3)}を示す死細胞 (type 1 死細胞) 以外は type 2 死細胞でありネクローシスは関与しないのである。また「電顕 TUNEL 法」³¹⁾で *in vivo* を観察するにしても、任意の切片に対する電顕観察のみとなり、TUNEL 陽性死細胞を発見することは困難であり、さらに中でも頻度の少ない type 2 死細胞に

関してはなおさらであろう。したがって、細胞死誘導によって対象のほぼすべてが細胞死をきたしていることがわかっている *in vitro* での観察では「電顕 TUNEL 法」³¹⁾ は有意義と思われるが、*in vivo* の場合は正常細胞の中から死細胞を見つけ出す必要があり、そのためには TUNEL 陽性死細胞を容易に発見できる光顕レベルで確認し、同切片の再包埋でその電顕像を観察する Epon-TUNEL 光顕・電顕観察法が有用と考えられた。

結 語

- 1) 胎生期マウス内耳の TUNEL 光顕観察で判定される ACD を示す死細胞はアポトーシスを示す死細胞 (type 1 死細胞) であり、NACD を示す死細胞は自己貧食性死細胞 (type 2 死細胞) である。また、これらは CDDP 負荷を行っても変わらず、NACD を示す死細胞にネクローシスを示す死細胞 (type 3A, 3B 死細胞) は含まれない。さらに type 1 死細胞は隣接細胞に貪食処理され、マクロファージの関与は少ないと考えられた。
- 2) 胎生期マウス内耳に何らかの理由で死細胞が過度に出現し、形成不全を来してしまう

ような危機的状態に対し、自身の生死の調節で対処することが type 2 死細胞の役割と予想され、type 1, type 2 両者とも“プログラム細胞死”と考えられた。

- 3) *in vivo* での死細胞の詳細な観察には本研究で用いた Epon-TUNEL 光顕・電顕観察法は有用な観察法の一つである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室 原田 保教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究の技術的な面で御支援助いただいた解剖学教室 佐々木和信教授に謝意を表すとともに、実験技術について直接御助言、御指導いただいた須田満寿美研究補助員をはじめとする解剖学教室員各位、また樹脂切片再包埋手技および電顕観察に多大の技術助力を惜しまれなかった上平賢三主任、須田泰司副主任をはじめとする組織・電子顕微鏡センター員各位に深謝致します。なお、本研究の一部は大学院重点特別経費（平成11年度）および川崎医科大学プロジェクト研究費（12-201）（14-105）の援助により行われた。

本論文の要旨は、第103回日本耳鼻咽喉科学会総会（2002年）、第12回日本耳科学会総会（2002年）にて発表した。

文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26 : 239-257, 1972
- 2) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284 : 555-556, 1980
- 3) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death : the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68 : 251-306, 1980
- 4) Clarke PGH : Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol 181 : 195-213, 1990
- 5) 平井滋夫 : マウス内耳発生における TUNEL 陽性死細胞の形態学的観察 - CDDP 投与による変化について。川崎医学会誌 28 : 287-296, 2002
- 6) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119 : 493-501, 1992
- 7) Kerr JFR : A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in

- lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90 : 419 – 435, 1965
- 8) Kerr JFR : Shrinkage necrosis : a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105 : 13 – 20, 1971
 - 9) Beaulaton J, Lockshin RA : The relation of programmed cell death to development and reproduction : comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol* 79 : 215 – 235, 1982
 - 10) Pilar G, Landmesser L : Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J Cell Biol* 68 : 339 – 356, 1976
 - 11) Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L : Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int Rev Cytol* 73 : 149 – 182, 1981
 - 12) Hornung JP, Koppel H, Clarke PGH : Endocytosis and autophagy in dying neurons : an ultrastructural study in chick embryos. *J Comp Neurol* 283 : 425 – 437, 1989
 - 13) Decker RS : Retrograde responses of developing lateral motor column neurons. *J Comp Neurol* 180 : 635 – 660, 1978
 - 14) Schweichel JU, Merker HJ : The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7 : 253 – 266, 1973
 - 15) Peluso JJ, England-Charlesworth C, Bolender DL, Steger RW : Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. *Cell Tissue Res* 211 : 105 – 115, 1980
 - 16) Clarke PGH : Labelling of dying neurones by peroxidase injected intravascularly in chick embryos. *Neurosci Lett* 30 : 223 – 228, 1982
 - 17) Clarke PGH : Identical populations of phagocytes and dying neurons revealed by intravascularly injected horseradish peroxidase, and by endogenous glutaraldehyde-resistant acid phosphatase, in the brains of chick embryos. *Histochem J* 16 : 955 – 969, 1984
 - 18) Clarke PGH, Hornung JP : Changes in the nuclei of dying neurons as studied with thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 283 : 438 – 449, 1989
 - 19) Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D, Vandenbunder B, Enrietto PJ : High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* 75 : 899 – 912, 1993
 - 20) Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS : Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture : the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17 : 1595 – 1607, 1996
 - 21) Chu-Wang IW, Oppenheim RW : Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. *J Comp Neurol* 177 : 33 – 57, 1978
 - 22) Sohal GS, Weidman TA : Ultrastructural sequence of embryonic cell death in normal and peripherally deprived tracheal nucleus. *Exp Neurol* 61 : 53 – 64, 1978
 - 23) McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S : An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14 : 549 – 558, 2000
 - 24) Marovitz WF, Shugar JM, Khan KM : The role of cellular degeneration in the normal development of (rat) otocyst. *Laryngoscope* 86 : 1413 – 1425, 1976
 - 25) Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF : Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13 : 18 – 54, 1988
 - 26) Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr : Roles for p 53 in growth arrest and apoptosis : putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17 : 3287 – 3299, 1998
 - 27) Szumiel I : Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res* 150 : S 92 – 101, 1998
 - 28) Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R : Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926 : 1 – 12, 2000

- 29) Samuilov VD, Oleskin AV, Lagunova EM : Programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)* 65 : 873-887, 2000
- 30) Lee CY, Baehrecke EH : Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 128 : 1443-1455, 2001
- 31) Hayashi R, Ito Y, Matsumoto K, Fujino Y, Otsuki Y : Quantitative differentiation of both free 3'-OH and 5'-OH DNA ends between heat-induced apoptosis and necrosis. *J Histochem Cytochem* 46 : 1051-1059, 1998