

〔原 著〕

口腔内の細胞，組織におけるアポトーシスに関する研究
—特に，in vitroにおけるアポトーシスの誘発と
in vivoにおける生理的細胞死の観察—

菅野 秀俊，安彦 善裕，賀来 亨

北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任：賀来 亨教授)

Study on apoptosis in oral cells and tissues
—Induction of apoptosis in vitro and observation
of physiological cell death in vivo—

Hidetoshi KANNO, Yoshiro ABIKO and Tohru KAKU

Department of Oral Pathology, School of Dentistry
HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief Prof Tohru KAKU)

Abstract

Programmed cell death during tissue development has been believed to indicate morphologically apoptotic features. However, few investigations have been reported regarding apoptosis in vivo because the method had not been established to prove apoptosis in situ before a TUNEL method was introduced. Therefore, the purpose of the present study was to establish an in vitro system of apoptosis in oral carcinoma cell-line, and to investigate the apoptosis during oral development using a TUNEL method and an electron microscopic (EM) observation.

An addition of anti-Fas antibody in medium induced apoptosis in the human oral carcinoma cell-line SAS, which was proved by a DNA ladder pattern on agarose gel electrophoresis and an apoptotic feature under EM. These cells showing TUNEL-positives confirmed that the TUNEL method was a useful for proof of apoptosis in situ.

TUNEL positive reactions were observed at the area of dental papilla, enamel organ, palatal fusion, circumference of Meckel's cartilage and oral developmental epithelium in fetal tissues of

受付・平成8年9月30日

rats Prior to the tooth emerging in the oral cavity, the positive reactions were seen at the connective tissue intervening between reduced enamel epithelium and oral epithelium, the fusion of those epithelia and the reduced enamel epithelium

EM findings showed apoptotic bodies featuring nuclear fragmentation with condensed chromatin in the tooth buds The circumference of Meckel's cartilage revealed rather necrotic feature than apoptotic feature The cells in oral epithelium indicating TUNEL positives possessed flatten nuclei with condensed chromatin and scant organelles During tooth eruption, apoptotic bodies and phagocytosis of apoptotic bodies by macrophages or epithelial cells were observed in the reduced enamel epithelium

These results indicated that physiological cell death via apoptotic processes might play an important role in the development and the maintenance of homeostasis in oral tissues

Key words Apoptosis, Oral, In vivo, In vitro, Cell death

緒 言

組織発生過程において著明な細胞増殖と共にあらゆる場面で、細胞死の起こっていることが、古くから知られている¹⁾。この細胞死は、細胞の分裂増殖と共に正常な組織発生過程においては決まった場所で、予定された時間に起こることからプログラム細胞死と呼ばれている。細胞死は長い間、壊死すなわちクローシスとして片付けられてきたが、Kerrら²⁾により新しい細胞死の概念「アポトーシス」が提唱されて以来、特に近年になりにはわかに注目をあびてきた。その細胞変化は、ネクローシスがミトコンドリアなどの細胞内小器官のダメージから始まり細胞自体の膨化が特徴であるのに対し、アポトーシスは細胞の縮小、ヌクレオソーム単位のDNAの断片化、核の断片化（アポトーシス小体の形成）を特徴としている^{3,4)}。胸腺の加齢に伴うものをはじめとし、胚芽における指間細胞などでのプログラム細胞死の大半がアポトーシスの形態をとると言われてきているが³⁻⁹⁾、in vivoにおけるアポトーシスの証明方法が必ずしも確実性の高いものではなかったために、口腔組織を含む全身諸臓器の組織発生過程におけるアポトーシ

スの関与については不明な点が少なくない。すなわち、光学顕微鏡における証明には種々の核染色によるアポトーシス小体存在の有無、また電子顕微鏡による超微構造の観察が行なわれてきた⁴⁻⁹⁾。前者では、明らかなアポトーシス小体を形成する以前の、DNAの断片化は始まっているものの明らかな核の断片化のみられないものは確認されず、後者では限られた範囲でのみ起こるアポトーシスを超薄切片で探し出す事は必ずしも容易ではない。また、生化学的にヌクレオソーム単位のDNAの断片化を検索する方法では限られた範囲、あるいは細胞のみのDNAを組織から抽出することは困難である。最近になり、Gavrieliら¹⁰⁾によって通常の組織切片すなわち、ホルマリン固定、パラフィン切片上でDNAの断片化を標識するTUNEL法が報告された。これまでの観察法に加えて、TUNEL法を用いることにより、in vivoにおけるアポトーシスの証明がより確実になったと考えられる。

本研究では、まずin vitroで口腔扁平上皮癌細胞株によるアポトーシスのモデル系を確立し、TUNEL法の有用性について確認し、動物にはラットを用い、胎生期から出生、成熟個体にいたるまでの様々な時期の口腔組織において

TUNEL法と電子顕微鏡による観察を行い、特に口蓋縫合部、歯胚、歯牙の発生過程、メッセル軟骨を含めた軟骨の消失過程、歯牙の萌出過程における周囲組織、成人における歯周組織について詳細に検索し、同部におけるアポトーシスの関与について考察することを目的とした。

材料及び方法

1. in vitroにおける口腔由来扁平上皮癌細胞のアポトーシスの誘発

TUNEL法の有用性について検討するために、in vitroにおいて人為的にアポトーシスを誘発させ、生化学的なアポトーシスのマーカーであるDNA ladderのみられる細胞について、TUNEL法を応用した。細胞にはヒト舌扁平上皮癌由来細胞株SASを用いた。培養液はD-Minimum Essential Medium (D-MEM, ニッスイ, 東京)中に15%牛胎児血清および抗生物質「ペニシリンG (明治製薬, 東京) 100IU/ml, ゲンタマイシン (Sigma, USA) 50uM/ml, ファイゴゾン (プリストール, マイヤーズスクライプ, 東京) 3 uM/ml」を添加したものを、75cm²/Coated Neck Tissue Culture Flask (岩城硝子, 東京) 5%CO₂, 37°Cの条件下で培養を行なった。継代培養は、Ca²⁺を含有しないphosphate buffered saline (PBS)にて洗浄後、0.25%トリプシン (Gibco, USA)にて15分間処理し細胞浮遊液を作製した。細胞がコンフルエントになった時点で継代を行ない、細胞数を1 x 10⁵個/mlに調整した細胞浮遊液を作製し、100mm Tissue Culture Dish (岩城硝子, 東京)と、Lab-Tek Chamber Slide Culture Chamber (Nunc Inc, USA)で培養を行なった。アポトーシス誘発のために、コンフルエントになった時点で、それぞれの培養液を血清の含まないものに交換し、抗Fasモノクローナル抗体 (MBL, 名古屋) 100ng/mlを添加し18時間培養を行なった。その後、培養皿上の細胞を、浮遊細胞と共にラバー

ポリスマンを用いて収集し、DNAの抽出を行なった。すなわち、遠沈により培養液を完全に除去し、100μg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany)を含有したDNA extraction buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM EDTA-NaOH pH 8.0, 0.1% SDS)にてインキュベートを行ない、フェノール、クロロホルム 1:1 溶液にてDNAを分離し、エタノールによって沈殿させ、風乾によりエタノールを蒸発させた後、10%TE溶液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA-NaOH)にて溶解した。同時にコントロールとして、アポトーシスの誘発を行わずに同様にDNAの抽出を行なった。Chamber slide上の細胞は同様にアポトーシスの誘発を行なった後Slideと共に、10%中性緩衝ホルマリンによる浸漬固定を施し、水洗の後コントロールとして用いた未処置のslideと共にTUNEL法を行なった。Chamber slide上の細胞の一部は同様の固定の後、Hoechst 33258による染色を行ない、蛍光顕微鏡による観察撮影を行なった。

2. 実験動物

実験動物にはSprague-Dawley系のラット計40匹を用い、胎生14, 16, 20日, 生後1, 3, 7, 14日, 2ヵ月時に屠殺し、TUNEL法, ならびに電子顕微鏡による観察を行った。ラットの飼育は、母体には通常の成熟ラットと同様に、オリエンタル社製MFの固形飼料と水道水を十分に与え、生後14日までは、母体と共にその母乳によって、その後は成熟ラットと同様に飼育した。

3. TUNEL法によるアポトーシスの観察

動物はジエチルエーテルの過剰吸引による屠殺の後、胎生期のものは、頭部を割断し、生後は上顎骨のみを摘出し、10%中性緩衝ホルマリンによる浸漬固定を行なった。12時間室温にて固定の後、緩衝液にて洗浄し、10% ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)で脱灰を行

なった。次いで、通法に従い脱水し、パラフィン包埋の後、5 μ m切片を作製し一部はヘマトキシリン・エオジン重染色を施し、他はTUNEL法のために用いた。

TUNEL法はGavrieliら¹⁰⁾の原法に基づいて行なった。概略すると、切片を脱パラフィン、脱キシレン、水洗の後、10 μ g/ml ProteinK (Boehringer Mannheim, Germany) 含有10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) による蛋白分解酵素処理を行ない、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの除去の後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) buffer (pH 7.2, 0.5M sodium cacodylate, 10mM CoCl₂, 1 mM DTT) (Gibco Brl, USA) とbiotin標識16-2'-deoxyuridine-5'triphosphate (UTP) (0.04nmol/ μ l) (Gibco Brl, USA) により断片化したDNAのビオチンによる標識を行なった。TB buffer (3 μ M Sodium citrate, 30 μ M sodium chloride) 中に浸漬した後、蒸留水により洗浄して、ビオチンにより標識されたDNAに対して、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ, 東京) を反応させ、最後にペルオキシダーゼ発色基質 (協和メデックス, 東京) のDiaminobenzidine (DAB) 反応を行った。陽性対照として、TdTとUTPの反応の前にDNaseI (Amersco, USA) による処理を行なった。

4. 電子顕微鏡による超微構造の観察

動物を光学顕微鏡標本作製時と同様に屠殺後、観察部を細切して、0.12M Sorensenの燐酸緩衝変法Karnovskyの固定液 (pH7.4, 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde) にて浸漬固定を行なった。12時間室温にて固定の後、緩衝液にて洗浄し、10%EDTAにて脱灰し、2%オスミウム酸で3時間室温にて後固定を施し、2%酢酸ウランでブロック染色を行なった。通法に従いアルコールにて脱水し、Epon 812にて包埋した。培養皿上の細胞をラバーポリスマ

ンで集め、遠沈し上清の培養液を捨て、PBSを入れピペッティングにより細胞を洗浄した後、さらに遠沈により細胞を集めて、動物固定時と同じ変法Karnovskyの固定液により室温で、12時間固定を行なった。緩衝液にて洗浄した後、2%オスミウム酸で1時間室温にて後固定を施し、2%酢酸ウランでブロック染色を行なった後、同様にEpon 812にて包埋した。超薄切片はLKB超ミクロトームで、ガラスナイフおよびダイヤモンドナイフを用いて作製した。超薄切片は酢酸ウラン、クエン鉛の二重染色を施した後、H-800電子顕微鏡 (日立社製) にて観察撮影した。尚、すべての試料はガラスナイフにより1 μ m切片を作製し、トルイジンブルー・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡にて観察撮影した。

結 果

1. 扁平上皮癌細胞株SASの抗Fas抗体によるアポトーシス誘発について

ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株SASは、培養開始後約2時間で静着し、完全に伸展するまでには約8時間を要した。伸展したSAS一つ一つは多角形をしており、コンフルエントになると、それらが集合し敷石状を呈していた (図1)。培養液を無血清のものと交換し、抗Fas抗体を添加して培養を継続すると、敷石状になった細胞

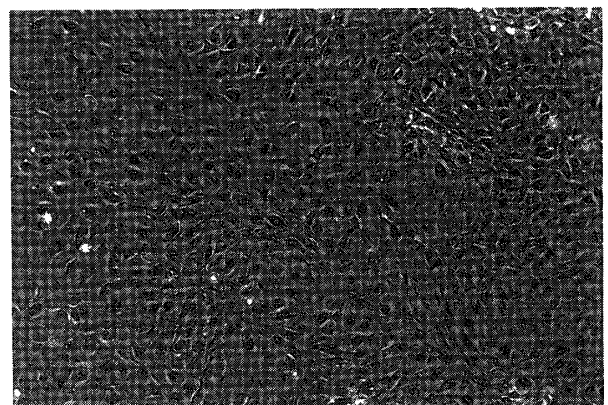


図1 SASの位相差顕微鏡像
多角形の細胞が敷石状に配列している。(×200)

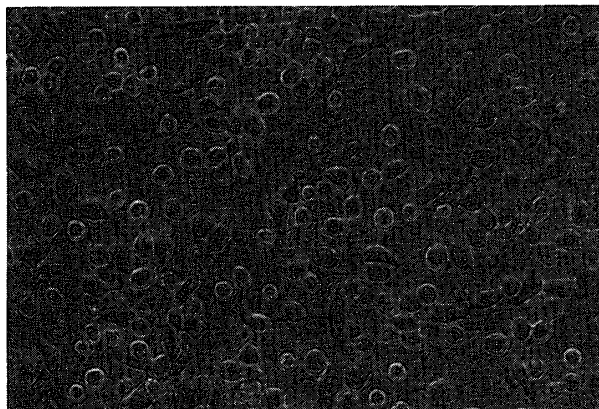


図2 SASに抗Fas抗体を作用させ18時間後細胞密度が疎となり、類円形を呈した細胞が観察される。(×400)

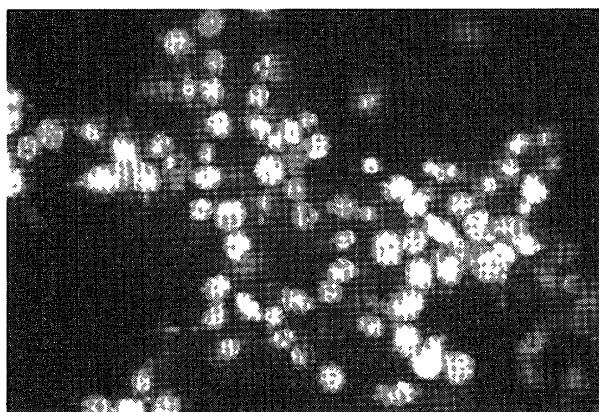


図3 図2の細胞に対してHoechst 33258による染色を施した像
類円形の細胞内の核は断片化しており、いわゆるアポトーシス小体の像を呈している。(×400)

が時間と共に類円形になり、細胞同士の接着や、細胞と培養皿との接着が弱い状態となっていた(図2)。18時間経過すると1/4程度の細胞は浮遊していたが、残り3/4程度は培養皿に残存していた。培養皿に残存した細胞について、Hoechst 33258による染色を行なった。細胞は収縮しているが、核はほぼ正常の細胞と同様に類円形をしたものもみられたが、細胞の多くには核の断片化を伴ったいわゆるアポトーシス小体が観察された(図3)。これらの細胞を電子顕微鏡で観察すると、類円形の細胞は多彩な像を呈していた。すなわち、細胞質は正常な細胞と同様であるものの核膜内側部が濃染しているも

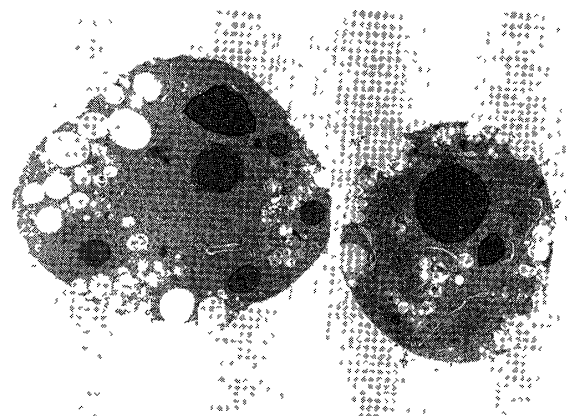


図4 浮遊した細胞の電子顕微鏡像
細胞が収縮し、細胞質内には濃染した核の断片化が観察され、典型的なアポトーシスの像となっていた。(×4000)

の、核が全体的に濃染しているもの、濃染した核が断片化しているもの、細胞質が核と共に濃染しており、細胞が著しく収縮しているもの、細胞質が崩壊しており断片化した核のみが残存しているものなどが観察された(図4)。さらにこれらの細胞から、DNAを抽出して2%アガロースゲルで電気泳動を行なったところ、アポトーシスに特徴的ないわゆるDNA ladderパターンが観察された(図3)。同様に培養皿に残存した細胞についてTUNEL法を行なった。TUNEL法は、最後の発色にDAB反応を用いたので陽性部は茶褐色を呈した反応として観察された。反応部はHoechst染色で、アポトーシスと認識された細胞よりも、より多くの細胞で観察された。すなわち、光学顕微鏡的に正常と思われた細胞の一部においても陽性反応が観察された(図4)。

2. 口腔組織発生過程のTUNEL法による観察

胎生14日目のラットの口腔上皮は、表層は1-2層の扁平上皮からなり、結合織側は立方上皮で、結合織との境界は平坦となっていた。臼歯相当部の上皮は陥入しており蕾状あるいは帽状に増殖しており、蕾状期から帽状期に相当する歯胚が形成されていた。TUNEL陽性反応は、歯乳頭ならびにエナメル器付近で散在性に

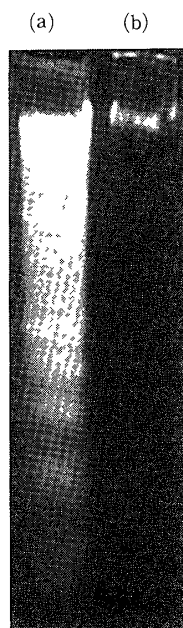


図5 抗Fas抗体により浮遊した細胞と、培養皿に残存した細胞のDNAを抽出しアガロースゲル上で電気泳動を行った像(a)とそのコントロール(b)
(a)においてアポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位のDNAの断片化, いわゆるDNA ladder patternが観察される。

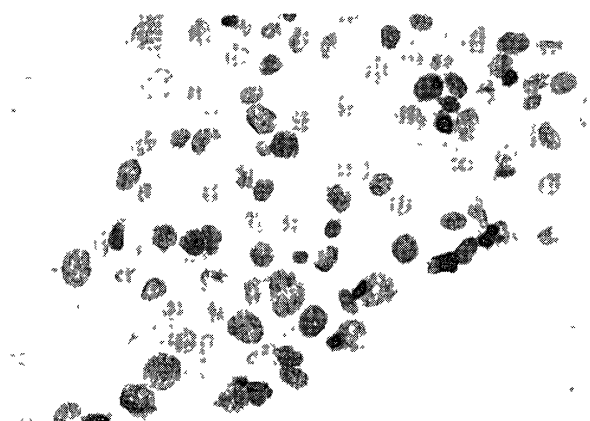


図6 培養皿に残存した細胞のTUNEL法による染色
明らかに核の断片化を伴った細胞以外の細胞においても陽性反応が観察される。(×400)

認められた(図5)。同部を強拡大で観察すると、陽性反応は核の上のみならず、アポトーシス小体を思わせる核より小さい顆粒状の物質としても認められた(図6)。胎生16日目になると左右口蓋突起の癒合が観察され、その部分においてTUNEL陽性反応が核上とアポトーシス小体を思わせる顆粒状物質の上に観察された(図7)。骨化の始まった下顎骨上方に存在しているメッケル軟骨では、その周囲を取り囲む様に散在性に陽性部が観察された(図8)。また、歯胚は帽状期となっていたが、歯胚におけるTUNEL陽性反応部は減少する傾向にあった。胎生20日目

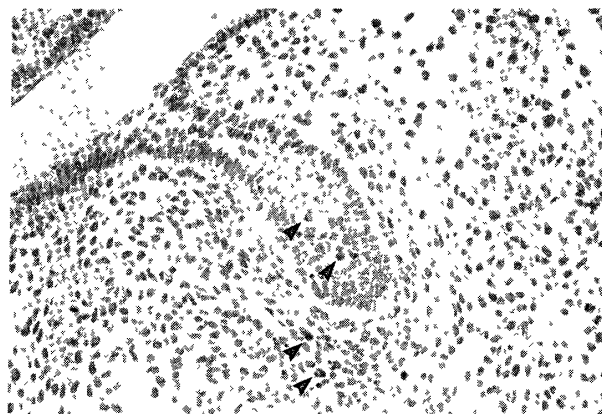


図7 胎生14日目の蕾状期から帽状期に相当する歯胚のTUNEL法による染色
TUNEL陽性反応は歯乳頭ならびにエナメル器付近で散在性に観察される。(×320)

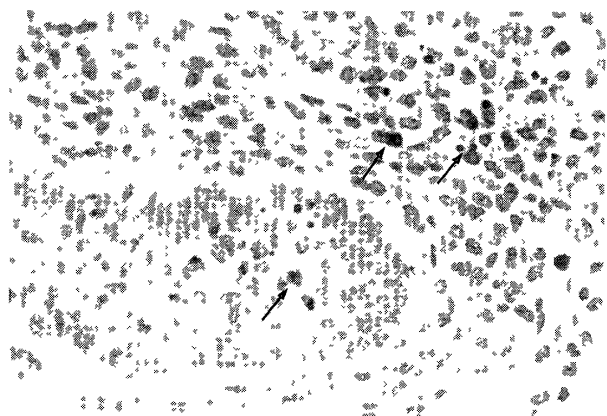


図8 図7の強拡大像
陽性反応は核の上のみならず、アポトーシス小体を思わせる核より小さい顆粒状の物質として観察される。(×590)

になると、口腔上皮は錯角化する傾向にあり扁平上皮3-4層まで厚みを増しており、TUNEL陽性部は表層あるいは表層から2層目の核に多数観察された(図9, 10)。また、舌粘膜上皮も錯角化しており、口腔上皮と同様に陽性反応を示す核が多数観察された。歯胚は鐘状期になっており、陽性部は歯堤の一部に僅かに観察されるのみであった。新生仔ラットにおいては、下顎骨の正中縫合部は未だ軟骨組織であるがその周囲には成熟した骨組織が形成されており、軟骨組織との境界部に一列にTUNEL陽性を示した核が配列していた(図11)。生後3日



図9 胎生16日目の左右口蓋突起の癒合部のTUNEL法による染色
TUNEL陽性反応は顆粒状の物質として口蓋突起癒合部に観察される。(×350)



図10 胎生16日目のメッケル軟骨部のTUNEL法による染色
陽性部はメッケル軟骨周囲を取り囲む様に存在している。(×160)

目になると、口腔上皮は厚みを増し、正角化を呈しており角質層直下部で多数の陽性反応が認められた。歯胚は鐘状期後期で、歯堤の断裂が確認され、孤立した歯堤の核の一部にTUNEL陽性反応がみられた(図12)。生後14日目の口腔上皮は3日目よりさらに厚みを増し正角化を伴った重層扁平上皮であったが、角質層直下部のTUNEL陽性核の出現は3日齢に比べて著しく減少していた(図13)。第一大臼歯の歯冠は完

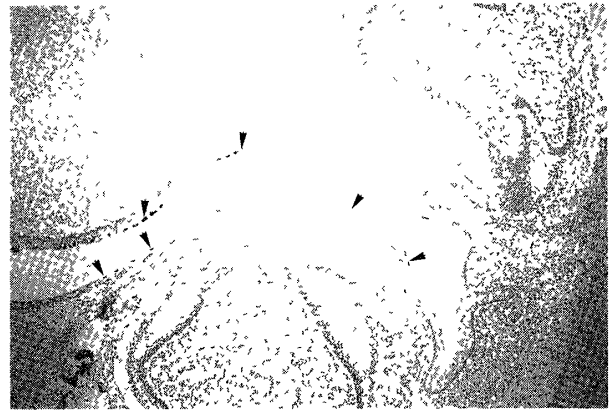


図11 胎生20日目のTUNEL法による染色
TUNEL陽性反応が口腔粘膜上皮部および舌粘膜上皮部に多数観察される。(×50)

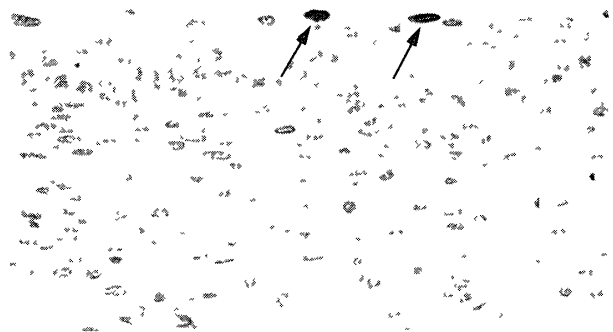


図12 図11の口腔粘膜上皮部の強拡大像
3-4層まで厚みを増した口腔上皮の表層あるいは表層から2層目の各に陽性反応が観察される。(×600)

成しており、歯冠上の骨は吸収していたが未萌出状態であった。歯冠のエナメル質は脱灰により消失しており、その直上には一部扁平化した退縮エナメル上皮が観察され、その上皮と口腔上皮の間には結合織が介在しておりその中の核に散在に陽性部が確認された(図14)。連続切片で観察すると、一部で結合織が消失して扁平化した退縮エナメル上皮と口腔上皮の癒合しているところが認められたが、その部では上皮全層にわたり陽性反応がみられた。退縮エナメル上皮は咬頭部付近で重層扁平上皮となっており、TUNEL陽性部は退縮エナメル芽細胞の扁平上皮に移行する部分で広く観察された(図15)。同部を強拡大で観察すると、陽性部は核の

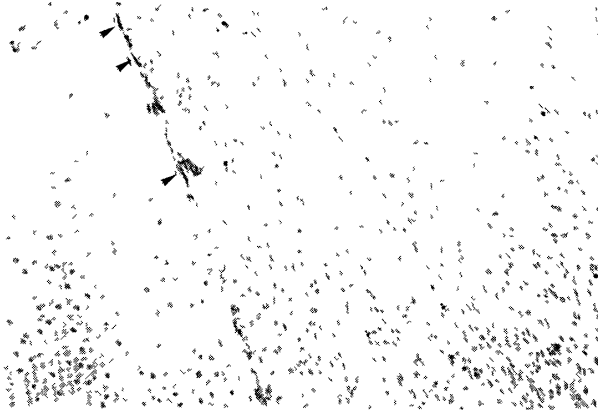


図13 新生仔ラットの下顎正中縫合部のTUNEL法による染色
成熟した骨組織と軟骨組織の境界部に、一列にTUNEL陽性反応が観察される。(×120)



図14 生後3日目の鐘状期後期のTUNEL法による染色
歯堤の断裂が観察され、孤立した歯堤の核の一部にTUNEL陽性反応が認められる。(×170)

上のみならず、核より小さい微細顆粒状物質としても観察され、アポトーシス小体を思わせるものであった(図16)。生後21日では歯冠の約1/3程度の萌出が確認され、咬頭側1/4程度の歯牙と接した上皮は付着上皮に転換された二次性上皮付着となっていたが、他の3/4程度は未だ退縮エナメル上皮による一次性的上皮付着であった。TUNEL陽性部は歯冠未萌出時



図15 生後14日目の第一臼歯歯冠上部のTUNEL法による染色
歯冠直上で、扁平化した退縮エナメル上皮と口腔上皮の間の結合織内にTUNEL陽性が散在性に観察される。(×140)

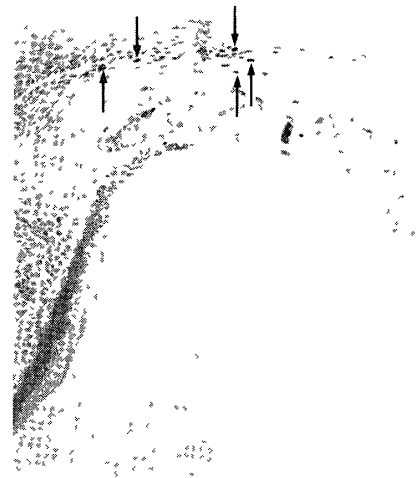


図16 生後14日目の第一臼歯歯冠上部のTUNEL法による染色
結合織が消失し、退縮エナメル上皮と口腔上皮が癒合したところでは、上皮全層にわたり、歯冠直上で陽性核が観察される。(×140)

程多くなかったものの、二次性上皮付着の上部、および一次性上皮付着との移行部付近で観察された。生後56日目になると、第一大臼歯は完全に萌出しており付着上皮が完成しており、付着上皮のターンオーバーの終末部、すなわち付着上皮上部の歯肉溝側と一致してその核に



図17 生後14日目の退縮エナメル上皮の中拡大像
TUNEL陽性部は退縮エナメル上皮が口腔上皮に移行する付近で時に観察される。(×350)

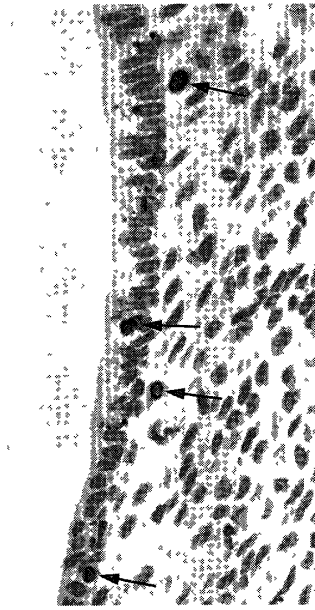


図18 図17の強拡大像
陽性部は核の上のみならず、アポトーシス小体を思わせる核より小さい微細顆粒状の物質上にも観察される。(×1200)



図19 付着上皮のTUNEL法による染色
付着上皮のターオーバーの終末部に一致してTUNEL陽性部が観察される。(×140)

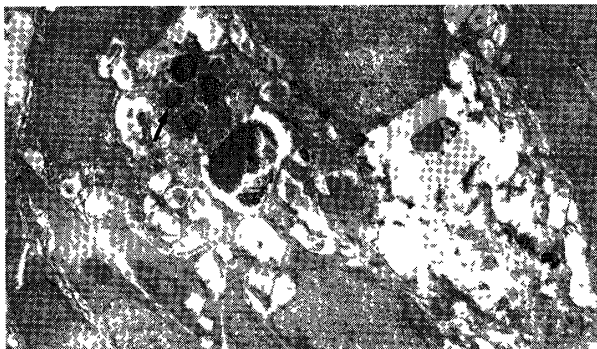


図20 胎生14日目の蕾状期から帽状期に相当する歯胚の電子顕微鏡像
核が濃縮し、断片化したアポトーシス小体が認められる。(×6600)

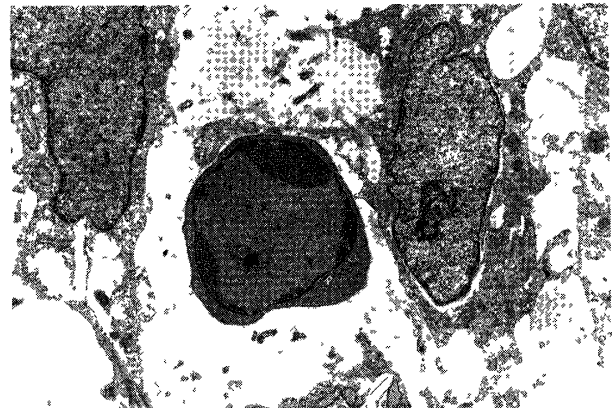


図21 図20と同一個体の他の部位の強拡大像
一部に核壁が濃染し、アポトーシスの初期を思わせる像が観察される。(×8800)

TUNEL陽性反応が確認された(図17)。また、口腔上皮は3日目のものとほぼ同様の形態を示しており、TUNEL陽性部も同様に角質直下部の核にみられたが、その数は僅かであった。

3. 口腔組織発生過程の電子顕微鏡的観察

TUNEL法により陽性反応のみられたところについて電子顕微鏡的にその微細構造を観察した。

歯胚においては、TUNEL陽性反応が比較的

多く認められた蕾状期から帽状期の初期に相当するものについて観察した。細胞質の大半は大きな核によって占められており、ところどころで核分裂像が観察されたが、一部に核が濃染し断片化を伴ったアポトーシス小体が観察された(図18)。

メッケル軟骨では周囲にTUNEL陽性部が観察されたが、その部に一致して細胞質の崩壊した細胞が観察された。明らかなアポトーシス小

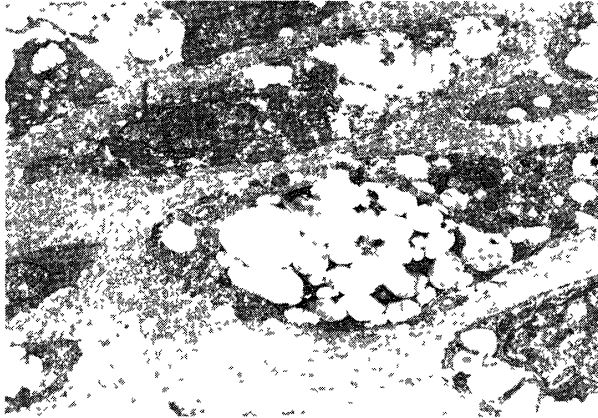


図22 メッケル軟骨周囲部の電子顕微鏡像
ミトコンドリアが拡大し細胞質が膨化して壊死に陥った細胞が認められる。(×5500)

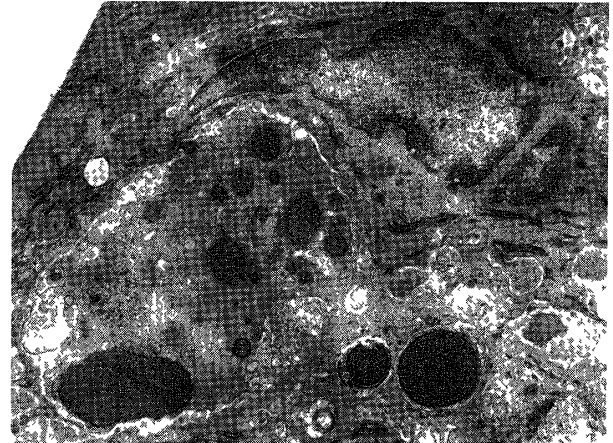


図24 図23と同一個体の他の部位の強拡大像
一部に、細胞が断片化した核と共に断片化する方向に向かっているblebbingの像が観察される。(×11000)

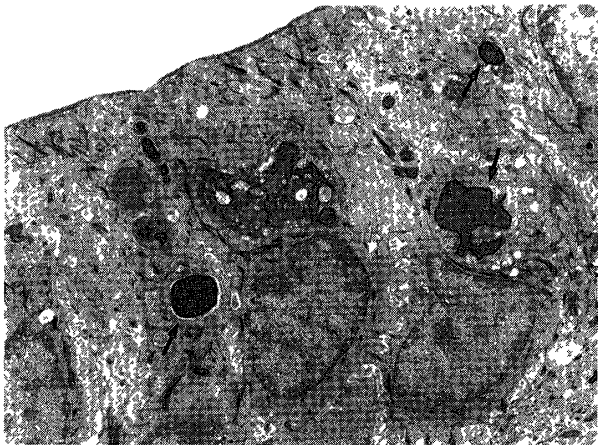


図23 退縮エナメル上皮の電子顕微鏡像
退縮エナメル芽細胞内にアポトーシス小体を思わせる高電子密度の物質が散見される。(×5300)

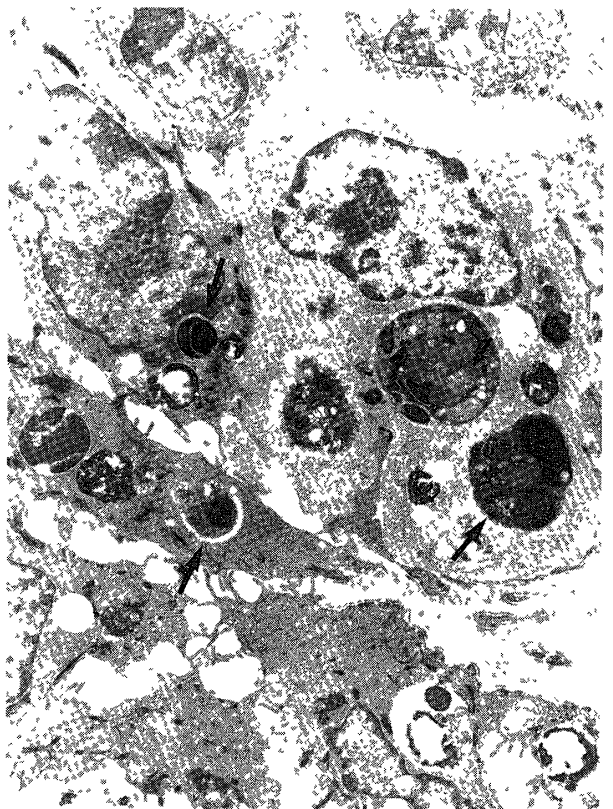


図25 退縮エナメル上皮の基底側部の電子顕微鏡強拡大像
一部で、アポトーシス小体を貪食したマクロファージ、および上皮細胞内にもアポトーシス小体の貪食が認められる。マクロファージ内には貪食された細胞のミトコンドリアの残存も観察される。(×9400)

体は観察されず、むしろ壊死の細胞死の形態をとっていた(図19)。発生過程の口腔上皮はTUNEL陽性部が最も多く観察された胎生20日目について電顕的に観察した。TUNEL陽性部が多数の核で確認された表層から1, 2層目の細胞は基底層の細胞と比べて細胞内小器官に乏しく核は扁平で濃縮していた。歯牙萌出過程におけるTUNEL陽性部を電顕的に観察すると、一部扁平化した退縮エナメル上皮と口腔上皮の間の結合織部ではアポトーシスを思わせる細胞あるいは著変を伴った細胞は観察されなかった。退縮エナメル上皮の部分では、主に退縮エ

ナメル芽細胞内に、濃染した核が類円形状に断片化した細胞、あるいは完全に細胞質が崩壊し断片化した核のみの状態となったものも観察さ

れた。前者を強拡大で観察するとミトコンドリアなどの細胞内小器官は比較的よく保持されており、隣接する細胞との間のデスモゾームは大部分が消失していたが、一部でその残存も確認された(図20, 21)。退縮エナメル上皮基底側部にはアポトーシス小体およびアポトーシス細胞を貪食したと思われるマクロファージが認められた。また、これらに隣接した上皮細胞内にもアポトーシス小体の取り込みの像が観察された(図22)。強拡大で観察すると、マクロファージ内には貪食された細胞のミトコンドリアの残存も確認された(図23)。

考 察

1. TUNEL法の有用性について

アポトーシスは当初Kerr²⁾らにより、電子顕微鏡による形態的な違いからネクロシスと区別されたが、形態的手法のみによって両者を厳密に区別することは必ずしも容易ではなく、特に光顕的には、明瞭なアポトーシス小体が存在しないかぎり困難である^{10, 11)}。さらに、このアポトーシス小体の観察される時期はそれらが貪食される前僅か2, 3時間にみられるのみであるとの報告¹²⁾もあり、このことがさらに光顕的にアポトーシスを観察することを困難にしているようである。生化学的にはヌクレオソーム単位のDNAの断片化、いわゆるDNA ladderがアポトーシスの証明に用いられてきているが、DNAの断片化は、形態的にアポトーシスの始まっている細胞のみならず、形態的には正常の細胞であってもアポトーシスの開始している細胞では極く初期から認められると言われており^{13, 14)}、このことからこれまでの形態的手法のみでアポトーシスの有無を判定することは難しいものと考えられる。最近、Gavrieliら¹⁰⁾によって in situでDNAの断片化を観察する方法、TUNEL法が報告された。TUNEL法は、TdT-mediated dUTP-biotin nick end label-

ingの頭文字から名づけられたが、通常の組織切片、すなわちホルマリン固定、パラフィン切片上で、断片化したDNAの3'末端をビオチン化したdUTPで標識し、これに対してペルオキシダーゼ標識のアビジンを反応させ、DAB反応により発色させる方法である。単なるDNAの断片化を標識する方法であり、必ずしも、アポトーシスに特異的なヌクレオソーム単位のDNAを標識する方法ではないが、僅かなDNAの断片化も検出しうることからアポトーシスをin situで検出する方法のひとつとして用いられてきている。本研究では、口蓋癒合部や、退縮エナメル上皮内でTUNEL法によって明らかなアポトーシス小体が観察されたが、これらは光顕的に強拡大で観察する必要があり、通常のH・E染色でみつけだすことは必ずしも容易ではないものであった。また、これらに隣接してところどころで形態的には正常な細胞にも陽性反応が観察され、生化学的にもアポトーシスの誘発が確認されたin vitroの実験でも、核の断片化の起きている細胞以外にも多数の陽性細胞が確認された。これらのことから、TUNEL法は、核の断片化が起こる前の比較的アポトーシスの初期の細胞でも検出し、アポトーシス小体ではその存在が強調されるため、アポトーシス検索のために極めて有用であることが確認された。

2. 口腔扁平上皮癌細胞株の抗Fas抗体のアポトーシス誘発について

抗Fas抗体はYoneharaら^{15, 16)}によってヒト細胞表層構造に対するモノクローナル抗体として、補体非依存的にアポトーシスを誘導するものとして調整された。この抗体が認識する分子FasはTNF/NGF受容体ファミリーに属する45 kDの細胞膜蛋白で、アミノ基末端を細胞外にカルボキシル基末端を細胞内に有するいわゆるI型細胞膜貫通蛋白質であることが明らかとなった。Yoneharaら¹⁵⁾は、種々の細胞株を始めとし、正常細胞に対する抗Fas抗体の影響について、

腫瘍壊死因子 (TNF) との比較検討を行なっている。それによると、細胞致死活性感受性はいずれもTNFより高く、特にinterferon- γ (INF- γ) との併用によって大部分の細胞に著しい致死活性を誘導している。癌細胞株である類表皮癌由来と結腸癌由来細胞株では抗Fas抗体単独では細胞死の誘発が僅かであるか、あるいは細胞致死活性非感受性であるものの、INF- γ との併用により著明な致死を誘導したと報告している。また、培養系における他のアポトーシス誘発因子として一般的なものに、培養液中からの血清の除去があげられている¹⁷⁻¹⁹⁾。本実験では、口腔由来扁平上皮癌SASを用い、無血清状態で抗Fas抗体の単独添加を行なった。その結果、抗Fas抗体を用いた先の報告¹⁵⁾とほぼ同じ時間内に少なくとも半分以上の細胞でアポトーシスの誘発が確認されており、抗Fas抗体による影響が無血清により助長されたことが示唆され、この実験系はin vitroにおける癌細胞のアポトーシス誘発の実験モデルとなるものと考えられた。

3. 口蓋癒合部におけるアポトーシスの関与について

二次口蓋の形成過程において、左右の口蓋突起の癒合時に口蓋突起表層部を覆っていた上皮細胞の消失が観察されることは古くから知られている^{20, 21)}。この上皮細胞の消失はプログラム細胞死によるものであると報告されてきたが^{1, 21-24)}、比較的最近になりこれとは異なった意見もいくつかみられる。Fitchett and Hay²⁵⁾は上皮細胞消失部を電顕的に観察し、その部に死細胞やマクロファージは観察されず、変性も受けていない生細胞のみであったことから上皮細胞から間葉系細胞へのトランスフォーメーションがあると考察している。一方、Carette and Ferguson²⁶⁾は、in vitroにおけるマウスモデルを用いて同部を観察したが、死細胞やトランスフォーメーションの所見は観察されなかつ

たことから、上皮の消失は、口蓋突起癒合時に上皮細胞の鼻側と口腔側への遊走が起こることによると述べている。本研究ではTUNEL法により一部でDNAの断片化を伴ったアポトーシス小体を思わせるものが観察され、その部分でプログラム細胞死の起こっていることを支持する結果となっていた。しかし、この結果は口蓋突起癒合過程の一時期をとらえているものであり、トランスフォーメーション説²⁵⁾や、上皮の遊走説²⁶⁾の関与も完全には否定できないものと思われた。

4. 歯胚の発生過程におけるアポトーシスの関与について

歯胚発生については、発生過程にある口腔上皮細胞の分裂増殖、それに隣接する間葉系細胞の分裂増殖に関連した研究がほとんどであり、同部における細胞死に着目した研究は極く僅かである。Kindaichi²⁷⁾は、胎生12-14日のマウス下顎臼歯歯胚を電顕的に観察し、従来のネクローシスとは形態的に異なった細胞死が、特にエナメル結節が出現する胎生14日目に多数観察されたとの報告をしている。この細胞死は、他の器官で記述された生理的変性細胞と一致していると述べている。この論文が発表された当時、アポトーシスと言う細胞死の概念が未だ一般的に受け入れられていなかったために、生理的変性細胞との表現を用いているが、クロマチンの濃縮を示す細胞が認められ、隣接細胞にとりこまれた像が観察されていることより、アポトーシスの概念と一致しているものと考えられた。本研究では、TUNEL法により陽性部は胎生14日目の蕾状期から帽状期にある歯胚の核の上とアポトーシス小体と言いうところに散在性に比較的多数観察されたが、胎生16日目においては陽性部が極く僅かとなっており、また、電顕的観察でもアポトーシス小体が観察されたが、Kindaichi²⁷⁾の報告に比べて僅かなものであった。このことから、歯胚の発生過程において積

極的にアポトーシスが行なわれる時期は極めて限られており、むしろこれらを見つけだすことは必ずしも容易ではないものと考えられた。最近、創傷治癒時の上皮の再生過程において、一旦上皮が過剰増殖した後、アポトーシスにより過剰な上皮が排除され正常な状態に戻るとの報告がなれている^{28, 40)}。歯胚の発生過程において比較的早期に、多くは上皮細胞内にアポトーシスが観察されることは、他の上皮での再生過程でみられる上皮の過剰増殖の後のアポトーシスによる排除機転が、歯胚の発生過程早期にも存在するものと考えられた。

5. 口腔上皮におけるアポトーシスの関与について

成熟した口腔上皮は重層扁平上皮であり、角化傾向は部位や種によって若干異なっているが、ラットにおける口腔上皮は付着上皮を除き、他はすべて基本的には正角化である。角化重層扁平上皮では、基底層の細胞が分裂し、上層に向かうにつれて分化し角質層では脱核した死細胞の状態であり、落屑と言われる現象が起こることは周知の事実であるが、この過程における細胞死がアポトーシスの範疇に入るものかどうかについては未だ不明な点が少なくない²⁹⁾。

形態的には、角質層に向かうにつれて核の濃縮、濃縮は観察されるものの、明かなアポトーシス小体は観察されていない。生化学的には、McCall and Cohen³⁰⁾はin vitroにおけるケラチノサイトの分化終末部に、DNAの断片化を観察しており、重層扁平上皮における角化へのアポトーシスの関与を示唆している。本研究では、口腔上皮の発生過程を追ってTUNEL法を応用したが、発生初期の1-2層からなる扁平上皮では陽性部が僅かであり、3-4層までに厚みをもって錯角化を伴った状態では表層部付近の多数の核に陽性反応が認められ、成熟した上皮では陽性部位は減少する傾向にあった。この点に関し、Abikoら³¹⁾はラットにおける胎仔と成

人の口腔上皮にTUNEL法を応用し、基底層の細胞数に対するTUNEL陽性核の割合をカウントしDesquamation index (落屑係数)として評価しており、その中で胎仔における口腔上皮の方が成熟のものよりDesquamation indexが高かった理由として、胎仔における基底細胞の分裂も多いことから上皮のターンオーバーの速さをあげている。本研究の結果も主観的にはあるがこの結果と一致していたが、発生初期においては陽性核が少なく、このことは発生初期においては、細胞の増殖が極めて優位であるものと思われた。また、付着上皮においては歯肉溝側の上皮最表層部、すなわち付着上皮ターンオーバーの終末部に一致して多数の陽性の核が観察された。付着上皮の基底側の細胞の分裂活性が口腔上皮のそれより高いとの報告^{32, 33)}を考え合わせると、付着上皮のターンオーバーが口腔上皮のターンオーバーよりも速いとのこれまでの考えを裏付ける結果となっていた^{32, 33)}。また、上皮の落屑は電顕的には明らかなアポトーシス小体は観察されないものの、核の濃縮、濃縮がみられその部にDNAの断片化が明らかに存在することによりアポトーシスの範疇に入るものと考えられた。

6. 軟骨細胞消失におけるアポトーシスの関与について

顎顔面領域の骨の大半は発生過程において膜内骨化により形成されていくが、下顎骨正中部をはじめ長管骨の大半は軟骨支柱内に骨が形成される軟骨内骨化によって形成される。この石灰化時に、細胞の変性、壊死のあることが指摘されてきているが³⁴⁻³⁶⁾、この詳細については不明な点が少なくない。最近になり、Zimmermann³⁷⁾は長管骨の骨端部の骨と軟骨の移行部を電顕的に詳細に観察し、肥大した軟骨細胞に隣接して、変性あるいはネクロシスの形態を伴った細胞死、すなわち小胞体の膨化や、ミトコンドリアの破壊を伴った細胞が観察されたと

の報告をしている。この論文の中でこの変性あるいはネクロシスに陥った細胞の周囲には正常な細胞も存在していたことより、電顕固定時のアーチファクトではないことを強調している。本研究で観察された下顎骨正中部の軟骨と骨組織の移行部におけるTUNEL陽性部は、ネクロシスの終末ではDNAの断片化が観察されることより、このネクロシスの部分に相当しているものと思われる。また、メッケル軟骨周囲部にもTUNEL陽性部が観察され、同部を電顕的に観察したが、先の報告³⁷⁾のようなネクロシスを思わせる細胞が観察された。以上のことから軟骨の消失に伴うプログラム細胞死はネクロシスの形態をとることが示唆された。

7. 歯牙の萌出過程におけるアポトーシスの関与について

歯牙の萌出は、歯冠上部の歯槽骨の吸収から初めることから、同部の骨吸収のメカニズムについて数多くの研究が行われてきた。それらによると、歯牙萌出時の骨吸収にはdental follicleが関わっており、その中に存在する多数の単球が破骨細胞の形成に関与しているとされている³⁷⁾。骨吸収の後には口腔粘膜上皮を貫通するが、この時のメカニズムについての報告はほとんどみあたらない。本研究において確認されたTUNEL陽性部は歯牙の萌出方向に向かって存在しており、その部は萌出に伴う周囲組織の歯冠による圧迫部に一致しているようであった。歯冠による圧迫で虚血が生じて細胞死が誘発されたものと考えられた。虚血による細胞死の多くはネクロシスとされてきたが^{39, 40)}、最近、一部の虚血による細胞死でアポトーシスの存在していることが指摘されてきている⁴¹⁻⁴³⁾。退縮エナメル上皮の部分では多数のTUNEL陽性のアポトーシス小体、さらに電子顕微鏡的にもアポトーシス小体が確認されており、虚血によるアポトーシスであることが示唆された。しかし、上皮と上皮の間の結合織に観察されたTUNEL

陽性細胞には明らかなアポトーシス小体は観察されておらず、電顕的にはアポトーシス小体はもとよりネクロシスを含めた明らかな細胞死も観察されなかった。アポトーシスの所見の一つとして、ネクロシス時には炎症がみられるもののアポトーシス時には炎症所見が認められないとのことがあげられている³⁾。結合織の部分には明らかな炎症性変化のみられなかったことより、アポトーシスがあったものと考えられたが、明らかなアポトーシス小体の確認されなかったことは、アポトーシスの経過が退縮エナメル上皮に比べて非常に短時間で経過したものと思われた。また、退縮エナメル上皮中に電顕的にマクロファージに貪食されたアポトーシス小体およびミトコンドリアの残存が認められ、隣接した上皮内にも貪食されたアポトーシス小体が観察された。この現象も、この部分でアポトーシスの起こったことを裏付ける結果と考えられた。

結 語

ネクロシスとは違った細胞死の概念アポトーシスに着眼し、口腔扁平上皮癌細胞株SASの抗Fas抗体による細胞死と口腔組織発生過程におけるプログラム細胞死におけるアポトーシス関与の有無について検索を行ない、以下に示す結果を得た。

1. ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株SASは無血清培養条件下で抗Fas抗体を添加することにより著しい細胞死が観察され、この細胞死はアポトーシスの経路を介したものと考えられた。
2. ラットの発生過程で口蓋癒合部をTUNEL法を用いてDNA断片化部をin situで観察すると、TUNEL陽性のアポトーシス小体と一部の核で陽性反応が観察された。
3. 歯胚の発生過程をTUNEL法で観察すると

蓄状期から帽状期にかけTUNEL陽性のアポトーシス小体が多数観察された。

4. 口腔上皮をTUNEL法で観察すると、上皮の落屑部に一致してアポトーシス陽性を示す核が観察され、電顕的にアポトーシス小体は認められなかったものの核の濃縮が観察され、アポトーシスによる細胞死の範疇にはいるものと思われた。
5. 軟骨細胞消失部において、TUNEL陽性部は下顎正中縫合部では軟骨組織と成熟した骨組織との移行部、およびメッケル軟骨の周囲を取り囲むように観察された。この陽性部を電顕的に観察すると、ネクローシスを思わせる細胞死の形態が観察された。
6. 歯牙の萌出過程においては、骨吸収後の歯冠上部の軟組織において歯牙の萌出に伴いTUNEL陽性の細胞が出現し、その一部で電顕的にもアポトーシスの像が確認された。

以上の結果から、口腔組織発生過程を含めた様々な部において、アポトーシスの経過をとる生理的な細胞死が観察され、これらは口腔組織の恒常性の維持のために重要な働きを担っているものと考えられた。

参考文献

1. Saunders JW Jr Death in embryonic systems Science 154 604-612, 1966
2. Kerr JFR, Willie AH, Currie AAR Apoptosis is a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics Br J Cancer 26 239-257, 1972
3. Kerr JFR, Harmon BV Definition and incidence of apoptosis an historical perspective Apoptosis The Molecular Basis of Cell Death Current Communication in Cell and Molecular Biology Tome1 LD, Cope FO (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1991
4. Majino G, Joris I Apoptosis, oncosis, and necrosis, an overview of cell death Am J Pathol 146 3-15, 1995
5. Abrams JM, White K, Fessler LI, Steller H Programmed cell death during drosophia embryogenesis Development 117 29-43, 1993
6. Tepass U, Fessler L, Aziz A, Hartenstein V Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in dorsophia Development 120 1929-1937, 1994
7. Tone S, Tanaka S, Kato Y The cell cycle and population kinetics on the programmed cell death in the limb-buds of normal and 5-bromodeoxyuridine-treated chick embryos Develop Growth & Differ 30 261-270, 1988
8. Van der Hoeven, Schimmang T, Volkmann Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant fused toes (Ft) Development 120 2601-2607, 1994
9. Raff M, Barres BA, Burne JF Programmed cell death and the control of cell survival lessons from the nervous system Sciences 262 695-700, 1993
10. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sassen SA Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, J Cell Biol 199 493-501, 1992
11. Kerr JFR, Searl J, Harmon BV, Bishop CJ Apoptosis Perspectives on Mammalian Cell Death Potten CS (ed) Oxford University Press, Oxford, pp 93-128, 1987
12. Brusch W, Klein L, Tenniswood M The biochemistry of cell death by apoptosis Biochem Cell Biol 88 1071-1074, 1990
13. Umansky SR The genetic program of cell death Hypothesis and some application transformation, cartinogenesis, ageing J Theor Biol 97 591-602, 1982
14. Motyka B, Reynolds JD Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of fabricius a possible role in B cell selection Eur J Immunol 21 1951-1958, 1991
15. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor J Exp Med 169 1747-1756, 1989

16. Yonehara S, Nishimura Y, Kishi S, Yonehara M, Takazawa K, Tamatani T, Ishii A A involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes induced by a superantigen *International Immunol* 6 1849-1856, 1994
17. Araki S, Shimada Y, Kaji K, Hayashi H Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation *Biochem Biophys Res Commun* 168 1994-1200, 1990
18. Galli G, Fratelli M Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line Inhibition by L-acetylcarnitine *Exp Cell Res* 204 54-60, 1993
19. Kulkarni GV, McCulloch CAG Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts *J Cell Sci* 107 1169-1179, 1994
20. Greene RM, Pratte RM Development aspect of secondary palate formation *J Embryol Exp Morphol* 36 225-245, 1976
21. Ferguson MWJ Palate development *Development* 103 [Suppl] 41-60, 1988
22. Smiley GR Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion *Arch oral Biol* 15 287-296, 1970
23. Clarke PGH Development cell death morphological diversity and multiple mechanism *Anat Embryol* 181 195-213, 1990
24. Meller SE, Barton LH Extracellular coat in developing human palatal processes Electron microscopy and ruthenium red binding *Anat Rec* 190 223-232, 1978
25. Fitchett JE, Hay ED Medial edge epithelium transforms to mesenchymal after embryonic palatal shelves fuse *Dev Biol* 131 455-474, 1989
26. Carette MJM, Ferguson MWJ The fate of medial edge epithelial cell during palatal fusion in vitro An analysis by DI labelling and confocal microscopy *Development* 114 379-388, 1992
27. Kindaichi K An electron microscopic study of cell death in molar tooth germ epithelia of mouse embryos *Arch histol jap* 43 289-304, 1980
28. Glaso M, Sandiv KU, Haaskyold E Apoptosis in the rat corneal epithelium during regeneration *APMS* 101 914-922, 1993
29. Paus R, Rosenbach T, Haas N, Czarnetzki BM Pattern of cell death the significance of apoptosis for dermatology *Exp Dermatol* 2 3-11, 1993
30. McCall CA, Cohen JJ Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes role of endogenous endonuclease *J Invest Dermatol* 97 111-114, 1991
31. Abiko Y, Kuraguchi J, Ohuchi T, Takahashi K, Haga H, Kaku T In situ labeling of fragmented nuclear DNA in the desquamation of junctional and gingival epithelia in rats *Jpn J Oral Biol* 36 673-675, 1994
32. Listgarten MA Normal development, structure, physiology and repair of gingival epithelium *Oral Sci Rev* 1 45-47, 1972
33. Skougad M Cell renewal, with special reference to the gingival epithelium In Staple PH (ed) *Advances in Oral Biology* vol 4, pp261-288, Academic Press, New York, London, 1970
34. Landis WJ, Paine MC, Glimcher MJ Electron microscopic observation of bone tissue prepared anhydrously in organic solvents *J Ultrastruct Res* 59 1-30, 1977
35. Landis WJ, Paine MC, Glimcher MJ Use of acrolein vapors for the anhydrous preparation of bone tissue for the electron microscopy *J Ultrastruct Res* 70 469-475, 1980
36. Akisaka T, Subita G, Shigenaga Y Ultrastructural observation on chick bone processed by quick freezing and freeze substitution *Cell Tissue Res* 247 469-475, 1986
37. Zimmermann B Occurrence of osteoblasts necroses during ossification of bone cortices in mouse fetuses *Cell Tissue Res* 275 345-353, 1994
38. Wise GE, Lin F The molecular biology of initiation of tooth eruption *J Dent Res* 74 303-306, 1995
39. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC and Solez K Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney morphology and pathogenesis *Medicine* 68 173-180, 1989
40. Shimizu A, Yamanaka N Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis *Virchow Archiv B cell Pathol* 64 171-180, 1993

41. Macmanus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E Global ischemia can cause DNA fragmentation inductive of apoptosis in rat brain *Neurosci Lett* (doublet) 164 89-92, 1993
42. Okamoto M, Matsumoto M, Ohtsuki T, Taguchi A, Mikoshiba K, Yanagihara T, Kamada T Internucleosomal DNA cleave involved in ischemia-induced neuronal death *Biochem Biophys Res Com* 196 1356-1362, 1993
43. Matsuyama T, Hata R, Tagaya M, Yamamoto Y, Nakajima T, Furuyama J, Wanaka A, Sugim M Fas antigen mRNA induction in post ischemic murine brain *Brain Brain Res* 657 342-346, 1994