

①

ラット前肢における指の形成－指間間葉細胞の  
細胞死と上皮陥入について

渡部 伸、似鳥 徹

岩手医科大学医学部、解剖学第2講座

(主任：佐藤洋一教授)



Finger formation of forelimbs in rat  
embryos with special reference to  
mesenchymal cell apoptosis and  
epithelial invagination

Shin Watanabe and Tohru Nitatori.

Department of Anatomy II, School of  
Medicine, Iwate Medical University,  
Morioka, Japan (Prof. Y. Satoh)

## Abstract

The present study examined the finger formation of forelimbs in rat embryos from 14th (E14) to 17th (E17) days of gestation. By TUNEL staining, positive cells first appeared in the interdigital mesenchymal area (IMA) immediately beneath the apical ectodermal ridge (AER) epithelium on E14 and spread into IMA from E14 to E16.5, resulting in the separation of the distal parts of each finger. The localization of TUNEL-positive cells in IMA was limited to the distal one third of each finger primordium. By electron microscopy, the dying cells in IMA possessed nuclei with condensed chromatin and were shrunk, indicating that they died by apoptosis. Moreover, many mesenchymal cells in the area had heterophagosomes containing cellular debris with condensed nuclear chromatin. From E16.5 to E17, the epithelial invagination rapidly occurred in IMA of



proximal two thirds of each finger, where few apoptotic cells were found. The large intercellular spaces were seen in the middle parts of the invaginating epithelium. These results suggest that the finger formation of rat forelimbs is mediated by the two different mechanisms and occurs during the two different stages; one is mesenchymal cell apoptosis and the other epithelial invagination.

key words

rat, forelimb, finger formation, apoptosis

ランニングタイトル

指の形成と細胞死

## I 緒言

脊椎動物の前肢および後肢の分離発生に伴い、その先端領域において指が形成される。指の形成過程では、指間に相当する部位の間葉細胞が細胞死に陥ることによって、各指が独立することが報告されている<sup>1、2)</sup>。

この間葉細胞の細胞死は何らかの外的要因によって引き起こされる細胞死とは異なり、死ぬことが運命づけられた細胞死で、

programmed cell death (PCD、予定細胞死) と呼ばれている<sup>3)</sup>。PCDは、定義の上では胎生期に起こる現象であり、細胞死を引き起こす遺伝子の発現に依存している<sup>4、5)</sup>。従って、環境の変化に伴う偶発的な要因で起こる細胞死とは異なる<sup>6)</sup>。

細胞死には2つの異なった機構が存在する。一つはネクローシス(壊死)であり、環境の変化に伴い偶発的に起こる細胞死で、例えば炎症などの組織障害に伴う細胞死である。ネクローシスでは細胞膜、特に、膜のチャネルが障害を



受けることによって膜の透過性が変化する。この変化によって細胞は膨化する。さらに障害が進めば、膜が破綻し、特にミトコンドリアが障害を受ければエネルギーの供給がたたれ、細胞は死に至る。最終的には細胞の膜系が破綻し、リソゾームを初め、細胞内プロテアーゼの活性化により細胞が溶解するか、他の細胞に貪食される。第二はアポトーシス (apoptosis) で、Kerrら<sup>7)</sup>によって提唱された死の機構である。アポトーシスは形態的な定義であり、細胞の萎縮や核クロマチンの濃縮といった形態変化の後、細胞が分断化されてアポトーシス小体が形成される。そして、最終的には他の細胞によって貪食され、処理される。初期の定義では、アポトーシスの過程にある細胞の細胞内小器官は形態的には正常であるとされていたが、現在ではそれらの器官の機能は低下しているものと考えられている<sup>8)</sup>。Wyllie<sup>9)</sup>は形態的变化に加え、核DNAがエンドヌクレアーゼの作用によってヌクレオゾーム単位で切断されることを報告して

いる。

生体内で生理的に起こるアポトーシスには、胸腺皮質リンパ球の淘汰に見られる細胞死や消化管上皮、皮膚の表皮を始め、組織を構成する細胞の更新に伴う細胞死が知られ、これらの細胞死はアポトーシスの典型と考えられている。

これらの細胞の死は細胞死遺伝子の発現を伴うとは限らず、したがってアポトーシスは前述したPCDと同義ではないものの、PCDの形態はアポトーシスのそれと一致する。胎生期や生後の生理的な細胞死と異なり、多くの病的な細胞死はこれまでネクローシスと考えられてきた。興味あることに、神経変性疾患や一過性前脳虚血に伴う神経細胞死はアポトーシスであることが報告され<sup>10)</sup>、このような病的な死もアポトーシスである可能性が示されるようになってきた。また、アポトーシスによる細胞死の多くで細胞死遺伝子発現の関与が報告されており<sup>11、12)</sup>、この遺伝子に基づく蛋白の発現を抑制することにより、アポトーシスが回避されること



も明らかにされている<sup>13、14)</sup>。一方では、生体を構成する細胞はアポトーシスを回避する機構を細胞自身が内在性に持っていることも、*bcl-2* 遺伝子の発見によって明らかにされた<sup>15)</sup>。これらの事実は、細胞の死がアポトーシスによるものかネクローシスによるものかを正確に検討する必要があることを示唆している。なぜなら、胎生期のアポトーシス抑制は先天異常を引き起こす可能性があるし、後天的に生じる病的なアポトーシスを抑制できれば疾患の治療につながると思われるからである。

アポトーシス現象を証明する一つの方法として、DNAのオリゴヌクレオゾーム単位への断片化を示す方法がある<sup>16)</sup>。近年、この変化を組織化学的に簡便に示す方法が開発された。即ちDNA二重鎖の切断に伴い露出された3'-OH断端を検出する方法である(TUNEL法)<sup>17)</sup>。しかし、DNA鎖の局部的断裂や任意の長さでの断片化による3'-OH断端の露出はネクローシスでも起こりうるので、TUNEL法に加え核クロマ

チンの濃縮や電子顕微鏡的な構造変化を同時に検証して、アポトーシス現象の証としなければならない。

以上の細胞死に関するこれまでの報告や検索に必須な研究方法に基づき、私たちは、ラット前肢の指形成過程における、TUNEL陽性細胞の局在と出現頻度の変化の解析、ならびに電子顕微鏡による微細形態の変化の観察を行い、胎生期の器官形成に伴う細胞死の現象、特に指間細胞の細胞死について検討した。次いでこの死をむかえた細胞がいかに処理されるのかについて、リソゾーム酵素、特にシステインプロテアーゼの代表的な酵素として知られるカテプシンB, H, L<sup>18-21)</sup>の局在を通して検討した。



## II 材料と方法

実験動物：本実験には胎生14日（E14）から17日（E17）までのWistar系ラット442匹884本の前肢を用いた。胎齢は交配した雌ラットに膣栓（vaginal plug）を確認した日を0日として決めた。麻酔下（エーテルと2-ブロモ-2-クロロ-1,1,1-トリフルオロエタン麻酔）に妊娠ラットを開腹し胎仔を摘出した後、前肢を採取し、0.1 M 燐酸緩衝液（pH 7.2, PB）で緩衝した4%パラホルムアルデヒド4%蔗糖溶液にて24時間浸漬固定した。7.5%蔗糖の入った0.1 M PBで10分間3回洗浄し、凍結保護のため15%および30%蔗糖溶液にそれぞれ12時間ずつ浸漬した後、凍結切片作成用包埋剤（OCT compound, Miles No. 4583）に-80℃で包埋した。同標本より、8  $\mu$ m厚の連続凍結切片をクリオスタット（SAKURA COLDTOME CM-50）で作製し、ゼラチン処理したスライドガラスに貼付した。

抗体：ウサギ抗ラットカテプシンB, H, L抗体

を作成し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した<sup>22、23</sup>）。

免疫組織化学：免疫反応の前処置として、凍結切片を0.3%過酸化水素含有メタノール溶液で20分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次いで、10%正常ヤギ血清で30分間処理して、非特異抗原による反応を抑制した。一次抗体の反応は、抗カテプシンB抗体（11  $\mu$ g/ $\mu$ l）、抗カテプシンH抗体（9  $\mu$ g/ $\mu$ l）、抗カテプシンL抗体（12  $\mu$ g/ $\mu$ l）をそれぞれ含む溶液にて、4℃で24時間行った。さらに、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体（Histofine SAB-PO Kit, ニチレイ）、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液でそれぞれ室温30分間反応させた。切片の洗浄は、0.1M PB（pH 7.2）に0.05M塩化ナトリウムと0.1% Tween 20（Sigma）を加えた溶液（TPBS）で5分間、3回ずつ行った。発色は0.0125% Diaminobenzidineと0.002%過酸化水素を加えた0.05M トリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）で



10分間行った。免疫反応の後、各切片を脱水、封入し、微分干渉顕微鏡（オリンパスAHS3）で観察した。

TUNEL染色：核DNA二重鎖の断裂によって現れる3'-OH端を標識化し、DNA断片化の有無を検索した。凍結切片を8 $\mu$ m厚で連続的に薄切し、内因性ペルオキシダーゼの不活化処理した後、Gavrieliら<sup>17)</sup>の方法に準じてTUNEL染色を行った。反応液は100mMカコジル酸ナトリウム（pH7.0）、0.1mM塩化コバルト、50 $\mu$ g/mlゼラチン、10nM/ml biotin-16-dUTP、及び100unit/ml terminal deoxynucleotidyl transferase（TdT）からなり、同溶液で37℃一時間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとの反応およびその後のDABによる発色反応は免疫組織化学反応と同様の手順で施行した。

TUNEL染色陽性細胞の局在と出現頻度の計測：手掌面に平行な手の縦断連続切片を3例

ずつ各胎生期毎に作製し、TUNEL染色を施した。その後、各切片に見られる陽性細胞の局在と出現頻度を測定し、それぞれの切片からの測定値を各時期の指形成領域に投射、図示した。さらに、各指間に出現する陽性細胞の数を測定し、棒グラフを作製した。

走査型共焦点レーザー顕微鏡による二重染色標本の観察：連続凍結切片を用いて、前述した免疫組織化学の手順により抗カテプシンB抗体との反応を行った後、二次抗体としてTexas Red標識ヤギ抗ウサギ抗体で室温にて1時間反応させた。さらに、同標本においてTUNEL反応を行った後、FITC標識アビジンにて室温で1時間処理した。TPBSにて5分間3回洗浄した後、蛍光消退防止剤入りグリセリンで封入し、共焦点走査型レーザー顕微鏡（オリンパスGB2000）により観察した。

電子顕微鏡による観察：採取したラット胎仔前肢を生理的食塩水で十分に洗った後、0.1 M カコジル酸緩衝液（pH 7.2）で調整した2%パ



ラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド  
固定液にて4℃で24時間浸漬固定した。さらに、  
7.5%蔗糖を含む同緩衝液で10分間3回洗浄後、  
オスミウム酸で後固定し、アルコール系列によ  
る脱水処理後、エポン包埋した。同試料をウル  
トラミクロトーム (Ultracut N, Reichert  
-Nissei) にて薄切し、酢酸ウランとクエン酸  
鉛で電子二重染色した後、透過型電子顕微鏡  
(日立H-7100) にて観察した。

### Ⅲ 結果

#### 1) ラット前肢の発生段階における形態について

E14におけるラット前肢の遠位端（手）の外観は、指の原基が不明瞭なため、全体的に円盤状を呈していた（図1a）。E14.5になると、指の原基となる間葉細胞の集積が明らかとなるため、指の原基と指間とが見分けられた（図1b）。E15からE15.5になると指間と指の原基の厚さと長さに明瞭な差が生じたため、指間が谷状に認められるようになった（図1c, d）。E16～E17にかけては、指間の厚さがいっそう薄くなり、指の先端部（爪の形成領域）を含め、指の末節部の分離、独立が明らかになった（図1e-g）。

#### 2) 発生段階におけるTUNEL陽性細胞の局在について

核DNA二重鎖切断の有無をTUNEL染色で検定し、指の形成過程における間葉細胞の細胞死



の局在と出現頻度を調べた。

手の縦断連続切片で見ると、E14では既に指の原基に沿って間葉細胞の集積が認められた

(図2a)。この時期のTUNEL染色では手の先端領域の上皮内およびその直下の間葉中に陽性細胞が認められた(図2b)。指間相当部位の間葉中にもTUNEL陽性細胞を認めることができたが、後の過程に比し未だ少数であった。

E14.5になると、TUNEL陽性細胞は手の先端、特に指間の先端部に一致して多数認められた

(図2c,d)。E15でもTUNEL陽性細胞はE14.5同様に手の先端領域の上皮下の間葉に多数見られた(図2e,f)。同陽性細胞の数は、指間の先端から深層に向かって、減少した。この傾向はE15.5でも同様であるが、指間におけるTUNEL陽性細胞の数はさらに増加した(図2g,h)。E16になるとTUNEL陽性細胞は、独立した指の末節部領域で対向する指の側面上皮直下の間葉にも多数認められた(図2i,j)。

E16.5では、指の末節骨と中節骨(第一指では

基節骨) の原基の間の領域で、将来の関節を形成する部位の間葉細胞がTUNEL染色で陽性であった(図2k, l)。独立した指の領域ではE16と同様に指間に面する指の側面上皮下の間葉中にTUNEL陽性細胞が見られた。この時期、指は主に末節骨の原基の領域までは独立していた。独立した指の基部で、未だ独立していない指間領域において、上皮が陥入している像が認められた。この傾向は、E17になるとより顕著となった(図2m, n)。E17でも将来の関節領域の間葉にTUNEL陽性の細胞が見られた。

TUNEL染色を施した連続切片をもとに、手の再構築を行った(図3)。これらの図からも明らかのように、指間の間葉細胞の死はE14からE16.5にかけて起こり、主に末節骨の原基の間に集中していた。即ち、この領域の間葉細胞の死は、E14の手の先端領域の上皮下から始まり、末節骨原基の間に広がるように起こった。この細胞死をむかえた間葉細胞の数と分布領域の広がりと共に、先端部から次第に指が独立し、



E16 から E16.5 にかけて末節骨原基から中節骨原基の遠位端、あるいは、両者の関節部領域まで指が分離、独立した（指の遠位 1/3 の分離、独立）。さらに、E17 になると、分離した指の基部の上皮が中節骨原基から基節骨原基にかけて陥入し、指の分離、独立がさらに進行していた（指の近位 2/3 の分離、独立）。

次に各指間の間葉に認められた TUNEL 陽性細胞の総数を各時期で調べた。その結果、各指間とも E15.5 に TUNEL 陽性細胞が最も多かった（図 4 a - d）。その数を各時期で平均してみると、やはり E15.5 がピークで、E16、E16.5、15 の順で多かった（図 4 e）。このことは、指の遠位端の分離、独立と間葉細胞の細胞死とが、深く関与していることを示している。

### 3) 電子顕微鏡による観察

光学顕微鏡レベルで TUNEL 陽性細胞が最も多く出現した E15.5 及び上皮が指間の間葉に陥入した E17 の標本を電子顕微鏡にて観察した。

E 1 5 . 5 の指間領域の間葉細胞は、大型で不整形の核を有し、細胞質はわずかで、細胞内小器官の発達も悪かった（図 5 a）。間葉細胞の核は主に正染色質からなり、明瞭な核小体は認められなかった。一部の間葉細胞は、核クロマチンの濃縮を示し、細胞質には明調な空胞の集積が見られた。これらの変性過程にある細胞周囲には、細胞質内に貪食した食胞を持つ間葉細胞が多数認められた（図 5 a, b）。この食胞には、凝集した核クロマチンや変性過程にある細胞の残滓が含まれていた。E 1 7 では指間先端部を覆う、上皮が指間の間葉方向に陥入し、この陥入上皮の先端部周囲には、健常な間葉細胞の集積が認められた（図 5 c）。E 1 7 では E 1 5 . 5 とは異なり、核クロマチンの濃縮といった、特徴的なアポトーシス形態を有する細胞はほとんど見られなかった。陥入した上皮の中央部に位置する細胞を見ると、細胞内に空胞が認められると共に、細胞間隙が強く拡大していた（図 5 c）。



#### 4) リソゾームシステインプロテアーゼの免疫組織化学

TUNEL 反応や電子顕微鏡による観察から細胞死に陥った間葉細胞は隣接する細胞に貪食されることが分かった。それ故、これらの細胞の食胞にリソゾーム酵素が存在するかどうかをリソゾームの代表的システインプロテアーゼとして知られているカテプシンB, H, L の局在から検討した。図6aに示す如く、指間の間葉細胞および上皮細胞にカテプシンBの強い免疫陽性反応が見られた。指間の間葉組織におけるカテプシンB陽性細胞の局在はTUNEL陽性細胞の分布とほぼ一致した(図6b, c)。この傾向はカテプシンHおよびLの免疫反応性の局在においても同様であった。

5) 共焦点レーザー顕微鏡によるカテプシンBとTUNEL反応の局在について  
カテプシンB, H, Lの免疫反応性の局在とTUNEL陽性反応の分布との間に非常に密接な

傾向が認められることから、E15.5の切片において、抗カテプシンB抗体とTUNEL反応の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。指間の間葉細胞の多くは、カテプシンBの局在を示す細顆粒状の免疫陽性反応を有していた。さらに、これらの細胞間には大小様々な大きさのTUNEL陽性反応が見られた（図7a）。これに加えて、カテプシンBの陽性反応とTUNEL陽性反応とが共存する顆粒状反応物を持った大型の細胞が指間間葉組織に数多く認められた（図7a,b）。



#### IV 考 察

本研究ではラット前肢の指が形成される過程を指間の間葉細胞の細胞死に注目して免疫組織化学、組織化学、超微形態学的方法を用いて検討した。ラットのE14からE17にかけて指原基の間葉中にある細胞のあるものは、核クロマチンの濃縮、細胞質の明調空胞の出現と細胞質の縮小化を生じ、隣接する細胞によって貪食処理されることが分かった。核DNAの二重鎖切断に伴う3'-OH端の有無を検定するTUNEL染色で、これら細胞の核が陽性に染まることが明らかになった。これらの形態的变化と核DNAの断片化は、Kerrら<sup>7)</sup>やWyllie<sup>9)</sup>の提唱した細胞死、即ちアポトーシスによる細胞死の定義に一致する。Hurle<sup>2,4)</sup>らは鶏胚の後肢発生時における指間間葉細胞の細胞死はアポトーシスであると報告しているが、この結果は本研究結果を強く支持するものである。

上述した如く、指形成に伴い指間間葉細胞はアポトーシスに陥る。しかし、TUNEL陽性の

核が多数出現するE15.5の指間の間葉を電子顕微鏡で観察しても、典型的なアポトーシスの形態を示す細胞は少ない。核クロマチンの濃縮した像の多くは間葉細胞に貪食された食胞内に多く認められた。実際、リソゾームの代表的システインプロテアーゼとして知られているカテプシンB, H, Lの抗体を用いて、免疫組織化学的に解析した結果、その陽性反応は指間の間葉細胞に一致して強く出現し、TUNEL陽性像と類似した局在を示した。さらに、TUNEL反応とカテプシンBの免疫反応の二重染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で見ると、両者が共存していた。このことは、DNAの二重鎖切断を生じた間葉細胞の多くは、隣接する細胞に貪食され、リソゾームで処理されることを示している。さらに、これらの事実は、間葉細胞の核クロマチンが濃縮し、細胞質が縮小化するまでの時間が短いこと、また、アポトーシス小体を形成し隣接する細胞に貪食されるまでの時間が短いことを示唆するものと思われる。



アポトーシスに陥る細胞の縮小化は、細胞膜の外側方への泡立ち(outward blebbing)によって起こると考えられている<sup>25)</sup>。しかし、本研究ではアポトーシスに陥った細胞の周囲にblebを見いだすことはできなかった。さらに、アポトーシスに陥った細胞の細胞質には多数の明調な空胞が認められた。この空胞形成は小腸絨毛上皮が絨毛の先端でアポトーシスに陥る過程や短時間前脳虚血後の海馬CA-1錐体神経細胞がアポトーシスに陥る過程でも認められ、これら空胞形成、即ちinward blebbingが細胞の縮小化に密接に、関与すると考えられている<sup>10、26、27)</sup>。本研究に見られたように、指の形成時においても、間葉細胞が細胞死に陥る際には、おそらく同様の機構でinward blebbingが起こり、明調空胞が形成されるものと考えられる。また、これと同時に、細胞質内ではこれらの空胞を形成する膜成分や細胞質蛋白が自己融解小体で分解され、さらに細胞質水分のdehydrationといった現象が起こり、結果と

して細胞が萎縮するものと考えられた。

HurleとGanan<sup>28)</sup>は、鶏胚の肢芽形成時に指間の外胚葉性先端隆起 (anterior ectodermal ridge, AER) や背側外胚葉 (dorsal ectoderm) を除去すると、同指間の間葉細胞の細胞死が抑制されることを明らかにした。本研究で観察したE14からE16.5までのラット前肢の指形成領域において、TUNEL陽性の間葉細胞が出現するのは、主に手の先端部で、指間に相当する領域を覆う上皮の直下の間葉に局限していた。さらに、この間葉細胞のアポトーシスの出現頻度と指の形成過程を調べた結果、細胞死が起こる領域が拡がると共に指間先端上皮も陥凹し、次第に指が分離、独立することが分かった。また、アポトーシスに陥った細胞の数と拡がりとは指が分離、独立する過程より0.5日から1日先行していた。これらの現象からも明らかなように、指間先端の上皮が上皮下の間葉細胞の死を促進することが指の分離、独立する過程に重要な役割を演じている。



上述した如く、指が分離、独立する過程においては、間葉細胞がアポトーシスに陥ることが重要である。しかし、本研究において明らかのように、間葉細胞のアポトーシスによって形成される指の高さは、末節骨あるいは中節骨（第3指）の原基までであった（指の遠位1/3）。興味ある現象として、E16.5からE17にかけ指間に陥凹した上皮は、更に、基節骨原基の深さまで指間を索状に陥入した。この索状に陥入した上皮はその中央で空胞化し、細胞間隙が拡がることによって、分離する事も示された。今日まで、指形成の機構は指間先端部の上皮とその直下の間葉細胞の相互作用によって惹起される、間葉細胞のアポトーシスによるとされてきた<sup>24)</sup>。しかし、本研究に示された如く、指間間葉細胞のアポトーシスに加え、上皮細胞の陥入が重要な要因であることが明らかとなった。

近年、指の形成にはzone of polarizing area (ZPA) より分泌され、肢の前後軸を決定するsonic hedge hog gene (hh遺伝子)

<sup>29)</sup> や背腹軸を決定する Wnt-7a 遺伝子<sup>30)</sup> が関与すると考えられている。本研究において、形態学的、組織化学的、免疫組織化学的な検索によって明らかにされた指間上皮細胞と間葉細胞との関係、特に、上皮直下の間葉細胞の細胞死の現象は、アポトーシスを誘導する物質の存在を示唆している。さらに、その死において現在知られている細胞死を惹起する遺伝子が関与するか否か、また、上皮の索状陥入を惹起する機構は何か、等多くの解決せねばならない問題がある。最も重要な点は、死を惹起する上皮細胞が発生段階の進行とともに単に増殖陥入する上皮細胞へと変換することである。おそらく指間の上皮細胞は発生過程にある細胞集団の中でも、急速に表現型を変える細胞の一つと思われる。これらの点に注目し、今後の研究が発展することが期待される。



稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導、御校閲を賜りました、大阪大学医学部解剖学第1講座内山安男教授に深く感謝いたします。また、ご協力、ご助言いただきました佐藤洋一教授、遠山稿二郎助教授を始めとする、解剖学第2講座の諸先生方ならびに整形外科学講座阿部正隆教授に心から御礼申し上げます。

## 文献

1) Fallon, J.F. and Cameron, J.: Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. Exp. Morph.* 40, 285-289, 1977.

2) Saunders, J.W.Jr. and Fallon, J. F.: Cell death in morphogenesis. In: *Major Problems in Developmental Biology* (ed. by M.Locke), pp. 289-314, Academic Press, New York, 1967.

3) Basis, M.: Studies on cell agony and death: an attempt at classification. In: *Ciba Foundation Symposium on Cellular Injury* (eds. by De Reuck A.V.S. and Knight J.), pp.287-328, Churchill, London, 1964.

4) Saunders, J.W.Jr., Gasseling, M. T. and Saunders, L.C.: Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Devl Biol.* 5, 149-178, 1962.

5) Hurle, J.M.: Cell Death in Developing Systems. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 13, 55-86,



1988.

6) Shier, W.T.,: Why study mechanisms of cell death? Meth. Achiev. Exp. Pathol. 13, 1-17, 1988.

7) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.: Apoptosis; A biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Brit. J. Cancer 26, 239-257, 1972.

8) Deckwerth, T.L. and Johnson, E.M.Jr.: Temporal analysis of events associated with programmed cell death (Apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. J. Cell Biol. 123, 1207-1222, 1993.

9) Wyllie, A.H.: Glucocortoid-induced thymocyte apoptosis with endogenous endonuclease activation. Nature 284, 555-556, 1980.

10) Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., et al.: Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following

transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 15, 1001-1011, 1995.

11) Wolpert, L.: Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation.: *J. Theoret. Biol.* 25, 1-47, 1969.

12) Bryant, P.J.: The polar coordinate model goes molecular. *Science* 259, 471-472, 1993.

13) Lieberman, M.W., Verbin, R.S., Landay, M., et al.: A probable role for protein synthesis in intestinal epithelial cell damage induced in vivo by cytosine arabinoside, nitrogen mustard, or X-irradiation. *Cancer Res.* 30, 942-951, 1970.

14) Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., et al.: Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macro molecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77, 1984.

15) Shigeno, T. Yamasaki, Y. Kato, G. et al.: Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurasci. Lett.*



120, 117-119, 1990.

16) Cohen, C.M., Xiao-Ming, S., Snowden, R.T. et al.: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* 286, 331-334, 1992.

17) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493-501, 1992.

18) Hurle, J.M. and Hinchliffe, J.R.: Cell death in the posterior necrotic zone (PNZ) of the chick wing-bud; a stereoscan and ultrastructural survey of autolysis and cell fragmentation. *J. Embryol. Exp. Morph.* 43, 123-136, 1978.

19) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y., et al.: Distribution of cathepsin B and H in rat tissue and peripheral blood cells. *J. Biochem.* 98, 87-93, 1985.

20) Ii, K., Hizawa, K., Komine, E., et al.:

Different immunolocalization of cathepsin B, H and L in the liver. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 1173-1175, 1985.

21) Watanabe, T., Waguri, T., Watanabe, M., et al.: Immunocytochemical localization of angiotensinogen and cathepsin B,H, and L in rat hepatocyte, with special reference to degradation of angiotensinogen in lysosomes after colchicine. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1899-1911, 1989.

22) Bando, Y., Kominami, E. and Katumata, N.: Purification and tissue distribution of cathepsin B. *J. Biochem.* 100, 35-42, 1986.

23) Ohsawa, Y., Nitatori, T., Higuchi, S., et al.: Lysosomal cystein and aspartic proteinases, acid phosphatase, and an endogenous cysteine proteinase inhibitor, cystatine- $\beta$ , in rat osteoclasts. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1075-1083, 1993.

24) Garcia-Martinez. V., and Hurle. J.M.: Internucleosomal DNA fragmentation and



programmed cell death ( PCD ) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. J. Cell Sci. 106, 201-208, 1993.

25) Saunders, J.W. and Gasseling, M.T.: Ectodermal-mesenchymal interaction in the origin of limb symmetry. In: Epithelial-mesenchymal interactions (eds. by Fleischmayer, R. and Billingham, R.E.), pp78-97, Williams and Wilkins, Baltimore, 1968.

26) Shibahara, T., Sato, N., Waguri, S., et al.: The fate of effective epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. Arch. Histol. Cytol. 58, 205-219, 1995.

27) Uchiyama, Y.: Apoptosis: The history and trends of its studies. Arch. Histol. Cytol. 58, 127-137, 1995.

28) Hurle, J.M. and Ganan, Y: Interdigital tissue chondrogenesis induced by the surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. J. Embryol. Exp. Morph. 94, 231-244,

1986.

29) Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., et al.: Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416, 1993.

30) Brian, A.P. and Andrew, P.M.: Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374, 350-353, 1995.



## 図の説明

図1：各発生段階にあるラット胎仔における前肢先端部（指）領域の実体顕微鏡像。

a: E14。前肢先端は円盤状を呈し、実体顕微鏡下では指の原基は認められない。b: E14.5。前肢先端部は平坦なカーブを描かず、指原基相当部位に比べ指間部が陥凹するため、凹凸状に認められる。cとd: E15とE15.5。指の原基と指間に相当する領域の厚さと長さが明かに異なるため、指の原基が明瞭に認められるようになる。eとf: E16とE16.5。指の原基と指間の差が一層明瞭になる。各指の遠位1/3が独立した形態になる。g: E17。各指の全体像が明瞭になり、遠位端には爪が形成されている。横線：50  $\mu$ m

図2：各発生段階にあるラット胎仔の前肢先端（手）領域凍結切片におけるTUNEL染色像。

a, c, e, g, i, k, mは手掌面に平行な切片の弱拡大像。b, d, f, h, j, l, nは、a, c, e, g, i, k, m

に図示した領域と同部位又は隣接切片の同様部位の強拡大像。

a, b: E14。手の先端部は平坦であるが、その上皮直下にはTUNEL陽性細胞が認められる（矢印）。  
c, d: E14.5。指間先端部の上皮直下に多数のTUNEL陽性細胞が認められる（矢印）。指原基にはより一層の間葉細胞の集積が認められる。e, f: E15。指間先端部の上皮直下に多数のTUNEL陽性細胞（矢印）が認められる。さらに、同陽性細胞は指間の深層に拡がっている。g, h: E15.5。TUNEL陽性細胞（矢印）は指間先端部から深層にかけ局在している。  
i, j: E16。指間先端部上皮が陥凹し、指の遠位1/3が分離、独立すると共に、TUNEL反応陽性細胞は独立した指の指間側面上皮直下に多数認められる（矢印）。k, l: E16.5。指間および独立した指の側面上皮下に見られたTUNEL陽性細胞は、この時期にはこれらの領域に少ない。m, n: E17。指の屈曲により、本切片では真の指先端（末節骨に相当する領域）部は切れていない。本切片に見られるように、TUNEL陽性細胞は指間や独立した指側面上皮の直下にはほ



とんど認められず、指原基の関節領域（中節骨と基節骨の間）が見られる（矢印）。指は、末節骨なし中節骨中部まで（指の遠位1/3）独立しているが、中節骨および基節骨原基の指間間葉には上皮が索状に陥入している。横線：50  $\mu$  m

図3：各発生段階にあるラット胎仔の前肢先端指形成領域におけるTUNEL陽性細胞の局在とその出現頻度。

TUNEL染色陽性反応を示す細胞一個を・で、20個を■で現し、図示した。a：E14, b：E14.5, c：E15, d：E15.5, e：E16, f：E16.5, g：E17

図4：各発生段階にあるラット胎仔の前肢先端指形成領域におけるTUNEL陽性細胞数出現頻度。

a：第一指と第二指との指間、b：第二指と第三指との指間、c：第三指と第四指との指間、d：第四指と第五指との指間、e：各時期の指間領域に見られるTUNEL陽性細胞の平均値±標準誤差。

図5：ラット胎仔の前肢先端部指間の電子顕微鏡像。

a：E15.5。指間先端部上皮下の間葉細胞。間葉細胞の多くは正染色質の豊富な核を有し、細胞質の小器官の発達は悪い。核の染色質が濃縮した間葉細胞の細胞質の多くに明調空胞が見られる（矢印）。染色質の濃縮した核の多くは間葉細胞の細胞質に見られる貪食食胞中に存在する（矢頭）。

b：E15.5。aと同様の領域の拡大像。間葉組織中には多くの貪食食胞を有する大型の細胞が認められる。これらの食胞中には、染色質の濃縮した核や細胞の残骸が見られる（矢印）。

c：E17。指間間葉織中に索状に陥入した上皮。同上皮の先端部直下には間葉細胞の集積が見られる。上皮直下、特に、上皮中央部上皮細胞には空胞が認められる（矢印）。また、同領域は、細胞間隙も拡大している。横線：a, bでは5  $\mu$  m、cでは50  $\mu$  m

図6：ラット胎仔（E15.5）の前肢先端指形成領域におけるカテプシンB（a, b）およびTUNEL陽性細胞の局在（c）。



カテプシンB免疫陽性反応は各指間先端上皮直下およびそれに続く指間深層の間葉細胞に陽性である (a)。aに図示した領域を拡大すると、カテプシンB陽性反応は顆粒状で、指間の大型細胞 (矢印) に認められる (b)。図5bと同様な領域のTUNEL染色像では、カテプシンB反応性に類似した粗大顆粒状の陽性反応が大型細胞内 (矢印) に見られる (c)。

横線：50  $\mu$  m

図7：ラット胎仔 (E15.5) の前肢先端指形成領域におけるカテプシンBの免疫染色とTUNEL染色の走査型レーザー二重染色像。

カテプシンBの陽性反応 (Texas-Red標識、赤色) は指間間葉細胞に細顆粒状に認められる。一方TUNEL陽性反応 (FITC標識、緑色) はカテプシンBの陽性細胞よりやや大きな顆粒として認められる。両者が共存し黄色の蛍光を有する細胞 (矢印) の多くは大型である (a)。大型細胞の細胞質 (矢頭) にはTUNEL反応とカテプシンBの免疫反応とが共存する領域とそれぞれが独立する領域とが認められる (b)。

横線：aでは50  $\mu$  m、bでは10  $\mu$  m.







Fig. 1-3  
21. 6. 66



**a**



**c**



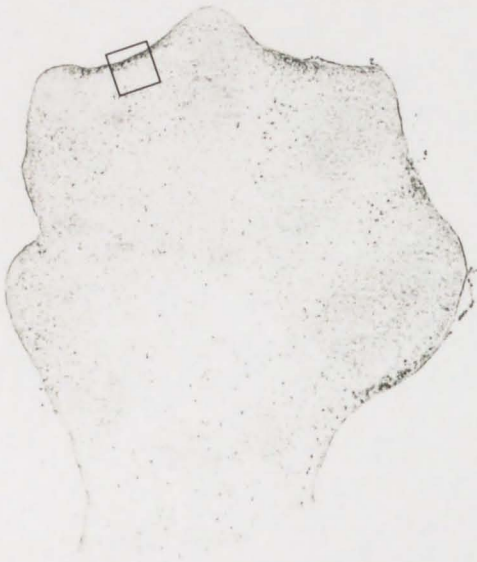
**b**



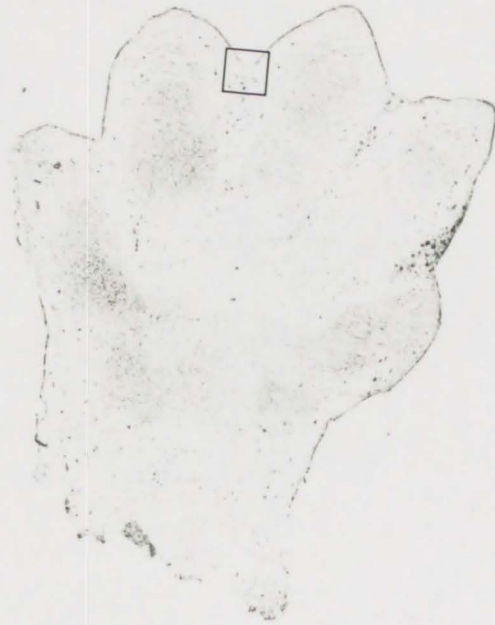
**d**



**e**



**g**



**f**



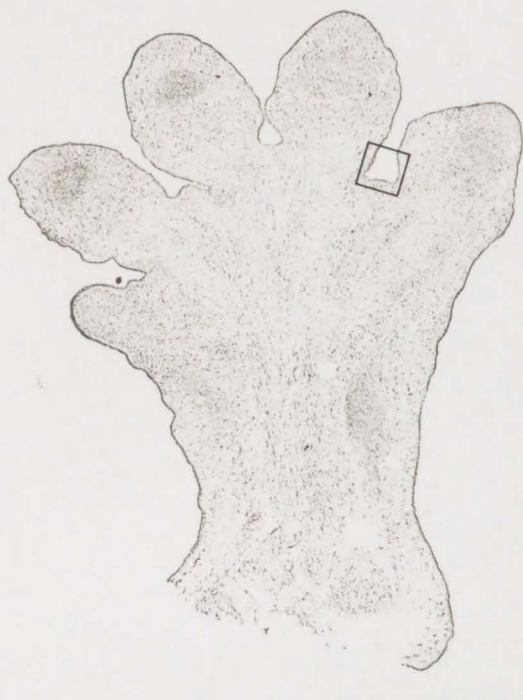
**h**



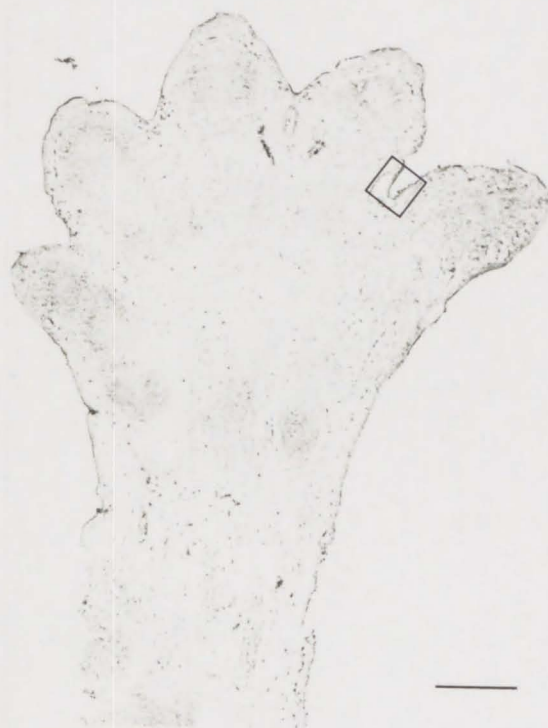
Fig. 2 e-h  
250 μm  
e, f, g, h  
100 μm



**i**



**k**



**j**

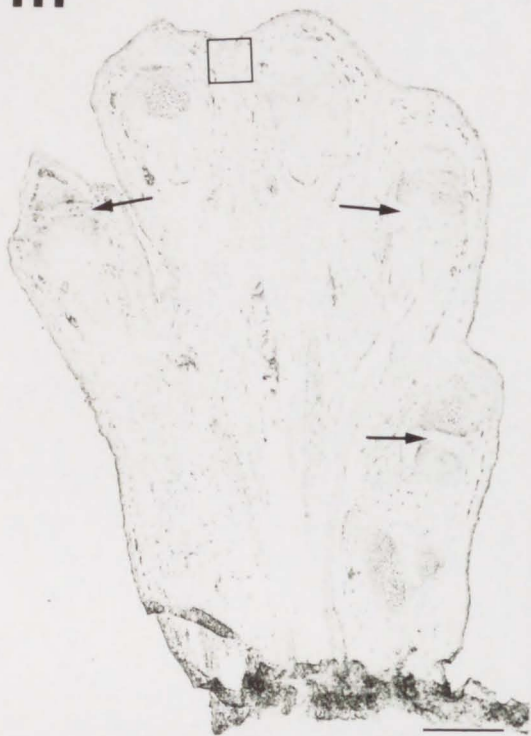


**l**



1982-1-1  
1982-1-1  
1982-1-1

m



n



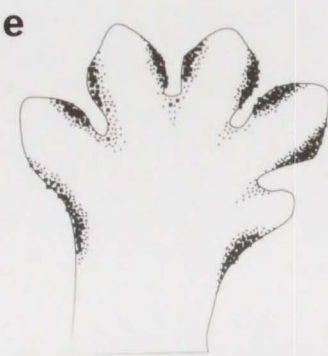
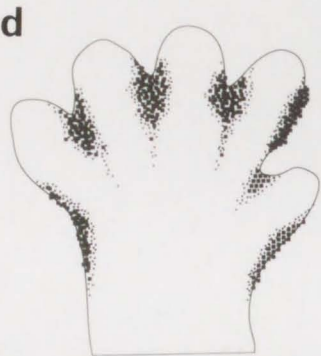
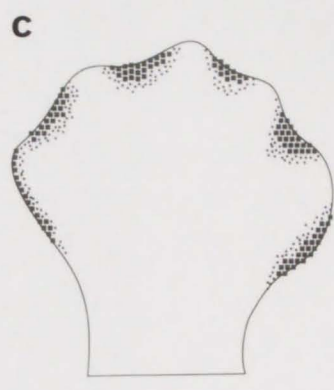
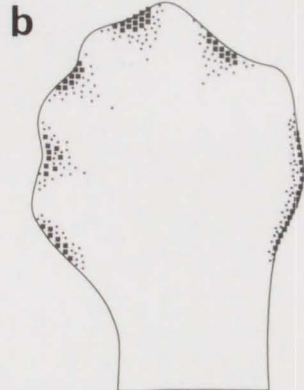
↑ Fig. 2 m-n

表 1 例

m × 200

n × 500





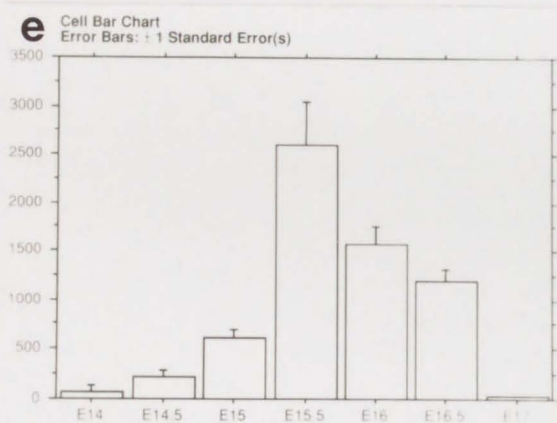
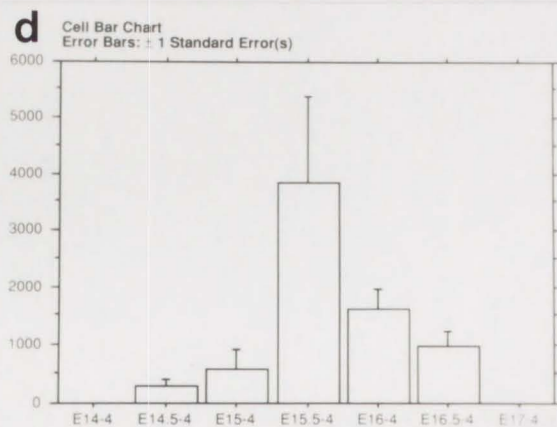
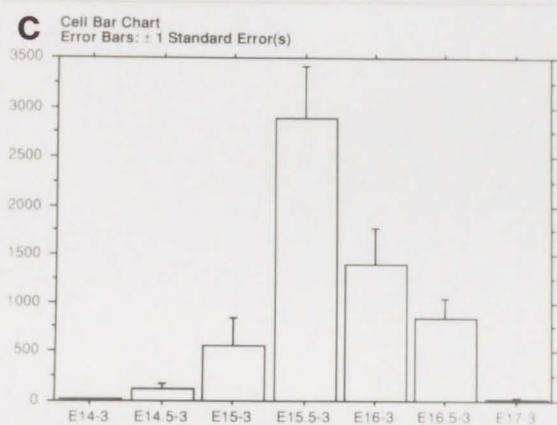
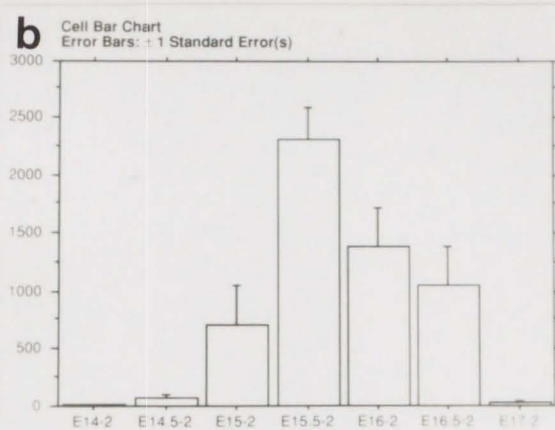
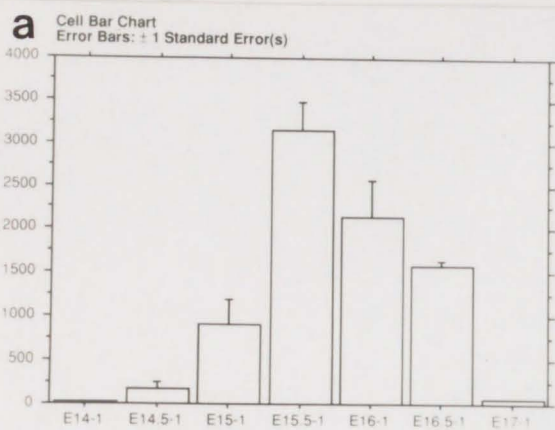
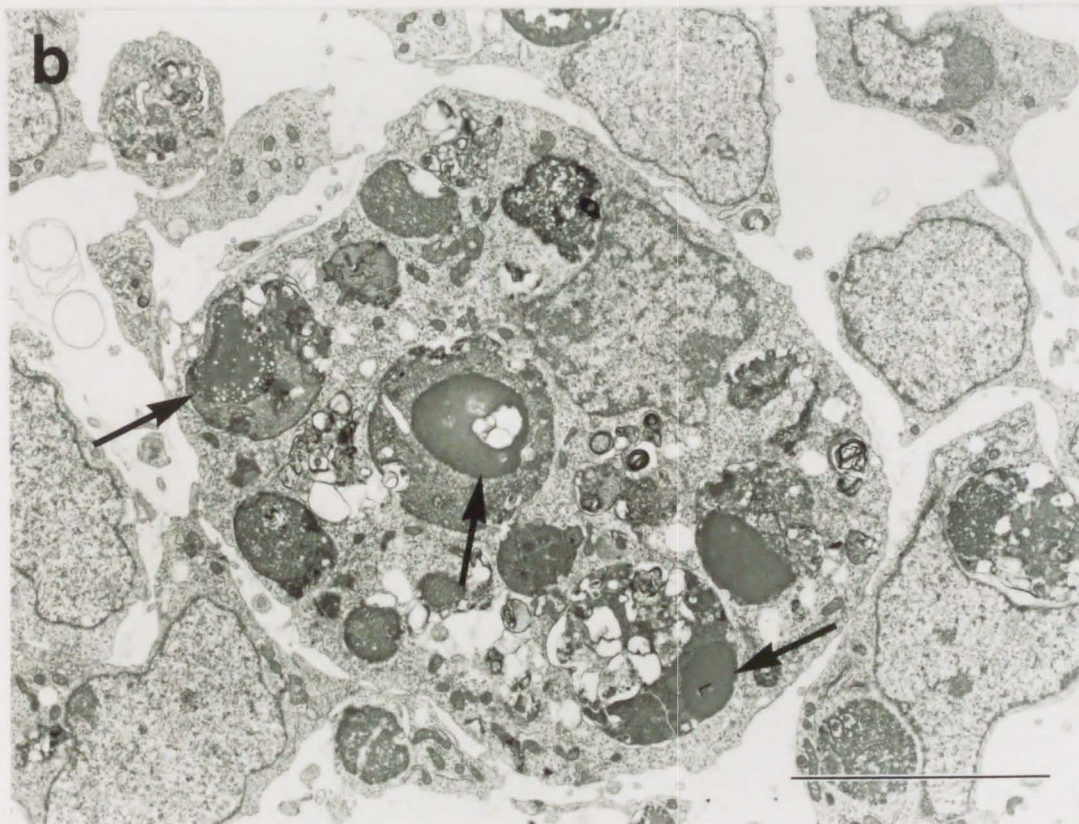
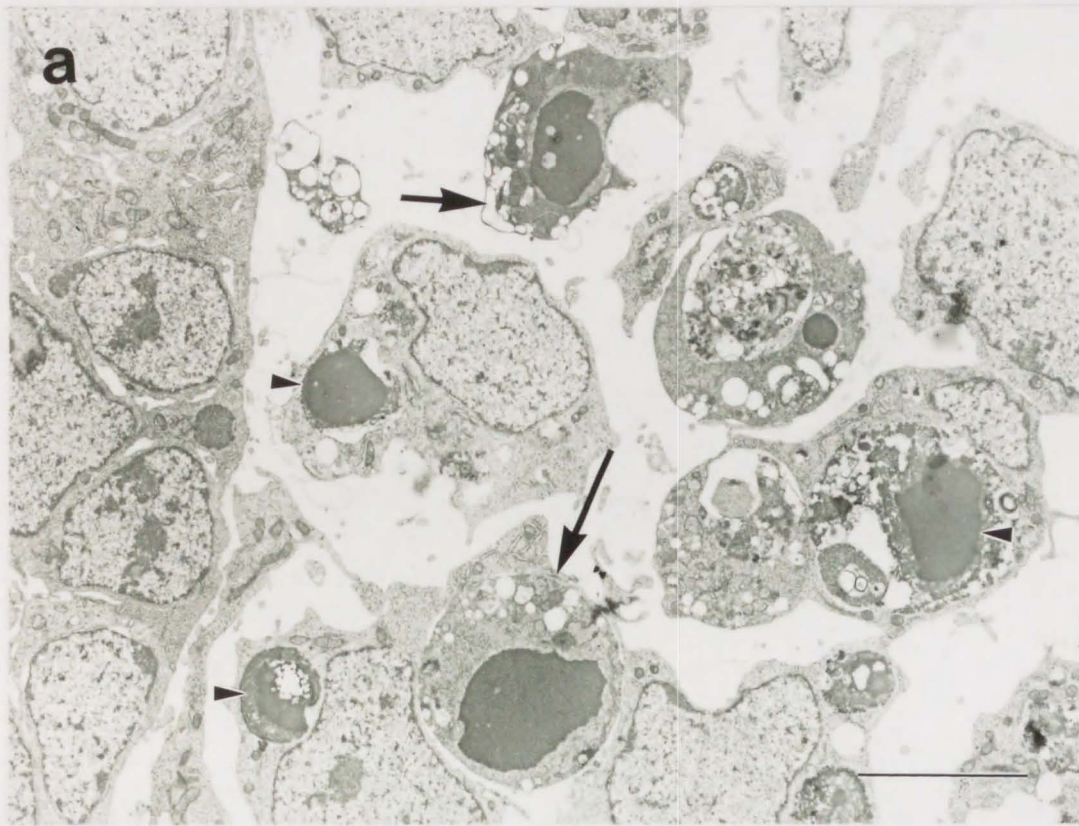
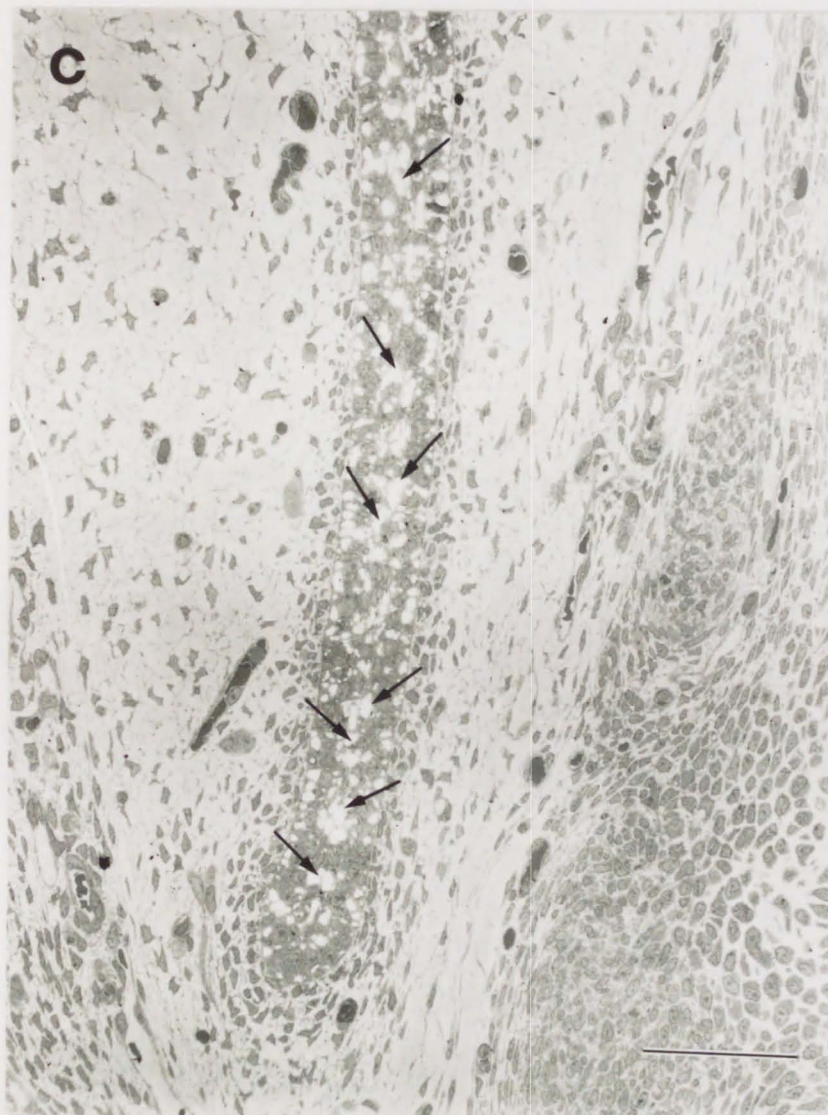


Fig. 4  
continued





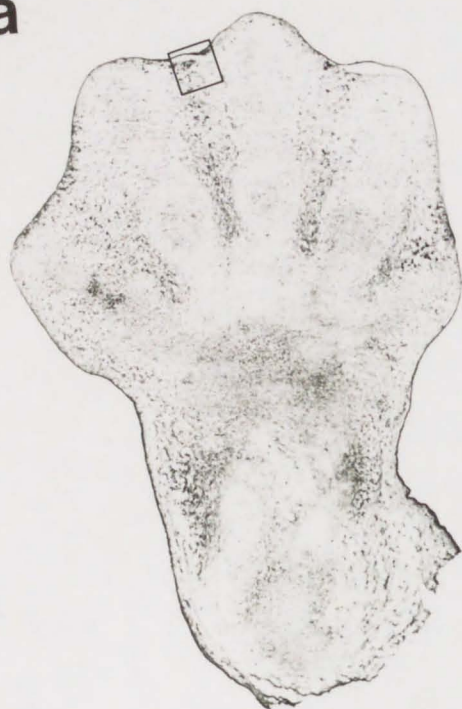




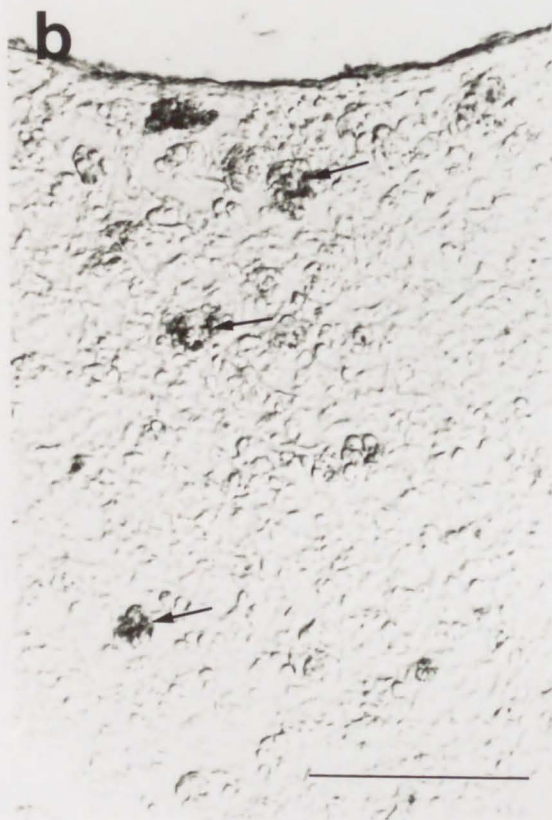
↑ Fig 5c  
Bifid  
x 200



**a**



**b**



**c**



† Fig 6a-c  
虎仔冲  
a x 200  
b c x 500

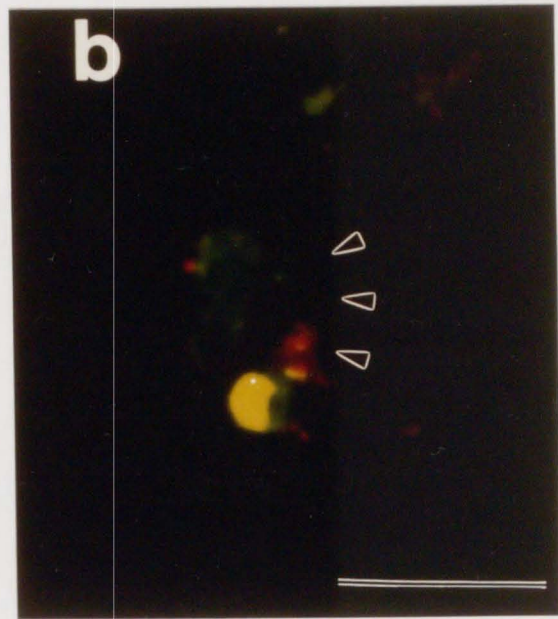
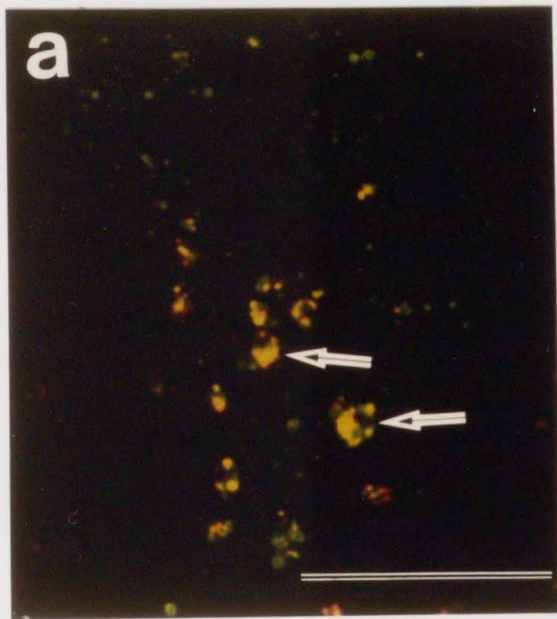


Fig 7a, b  
rest of  
a cell  
b 2700



