

# 貪食されたアポトーシス小体の 連続切片法による電子顕微鏡的解析

Electron microscopic observations of apoptotic bodies engulfed by  
adjacent ameloblasts revealed by serial sectioning method

西川 純雄

Sumio NISHIKAWA

「鶴見大学紀要」第48号 第4部

人文・社会・自然科学編（平成23年 3 月）別刷

# 貪食されたアポトーシス小体の連続切片法による電子顕微鏡的解析

Electron microscopic observations of apoptotic bodies engulfed by adjacent ameloblasts revealed by serial sectioning method

西 川 純 雄

Sumio NISHIKAWA

## 要旨

透過型電子顕微鏡と連続超薄切片法を用いてラット切歯移行期エナメル芽細胞のアポトーシス断片を解析した。アポトーシス断片は完全にエナメル芽細胞内に取り込まれていて、この細胞が断片を貪食していることが明らかとなった。このように、連続超薄切片法は厚みのある構造の全体像を把握するのに有効な方法の一つであることが示された。

## はじめに

アポトーシスは広く発生の過程で生じ四肢の指の形成や両生類の変態前のオタマジャクシの尾の吸収等に重要な役割をはたしていることが知られている (Alberts et al., 2010)。アポトーシスの過程では細胞は断片化し、結果として生じた断片、すなわちアポトーシス小体はマクロファージや樹状細胞といった食作用のある細胞によって取り込まれる。したがって、これらの細胞にアポトーシス小体が観察出来れば、これは食作用により取り込まれたと考えて差し支えないように思われる。ところが、アポトーシス小体は同時に隣接するアポトーシスを起こした細胞と同種の細胞によっても取り込まれることが早くから知られている (Kerr et al., 1972)。したがって、上皮であれば上皮細胞に取り込まれることになる。このような細胞は本来食細胞ではないので、本当に細胞内にアポトーシス断片が取り込まれているのか、ただ単に側に接しているアポトーシス断片が切片の切断面で、あたかも細胞内にあるかのように見えているのか、区別することは大変難しい。このことを解決する一つの方法は電子顕微鏡レベルにおける連続切片の作製とその解析である。

歯科領域では、歯牙のエナメル質形成はエナメル芽細胞が関与している。このエナメル質形成は、その発生過程で大きく2段階に分けることができる。すなわち、エナメル基質を盛んに形成する基質形成期と形成されたエナメル基質を吸収し、さらに石灰化度を上昇させる成熟期である。基質形成期と成熟期の間には短い移行期が存在しこの時期に全エナメル芽細胞の25%はアポトーシスにより消失することが知られている (Smith and Warshawsky, 1977; Nishikawa and Sasaki,

1995)。アポトーシス断片は上皮層に侵入してきたマクロファージまたは樹状細胞により貪食処理される (Nishikawa and Sasaki, 1996)。しかし、同時にエナメル芽細胞自身や隣接する上皮細胞である乳頭層細胞によってもアポトーシス断片は取り込まれる (Nishikawa and Sasaki, 1996)。本研究では、エナメル芽細胞に見られるアポトーシス断片様の構造が本当に細胞内に存在するか、連続超薄切片を用いて検討した。

## 材料と方法

Wistar系成熟雄ラット (210–220g) を用いた。動物は sodium pentobarbital で麻酔し、5% glutaraldehyde, 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3 で15分間灌流固定し、その後同じ固定液で2時間固定した。上顎と下顎を切り出し5% EDTA, pH 7.3 中に入れ、低温で17日間脱灰した。

脱灰した切歯を0.5 mm厚にカミソリで薄切し、2% 四酸化オスミウムで2時間後固定しエタノール脱水ののち、Epon 812 (TAAB, Reading, UK) に包埋した。ダイヤモンドナイフにより切歯の移行期エナメル芽細胞を含む部分の連続超薄切片を作製しコロジオン膜やフォルムパール膜を張ったスロットメッシュ (1.5×2 mm) に回収し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を行った。カーボンコーティングで補強し、Jeol JEM1200EXII (Jeol, Tokyo, Japan) 電子顕微鏡で観察した。

連続切片の回収には若干の工夫を施した。すなわち、ダイヤモンドナイフのポート上の連続切片の上に膜を張っていないスロットメッシュを静かに載せた。この状態ではメッシュの枠内の連続切片は全く動かない。

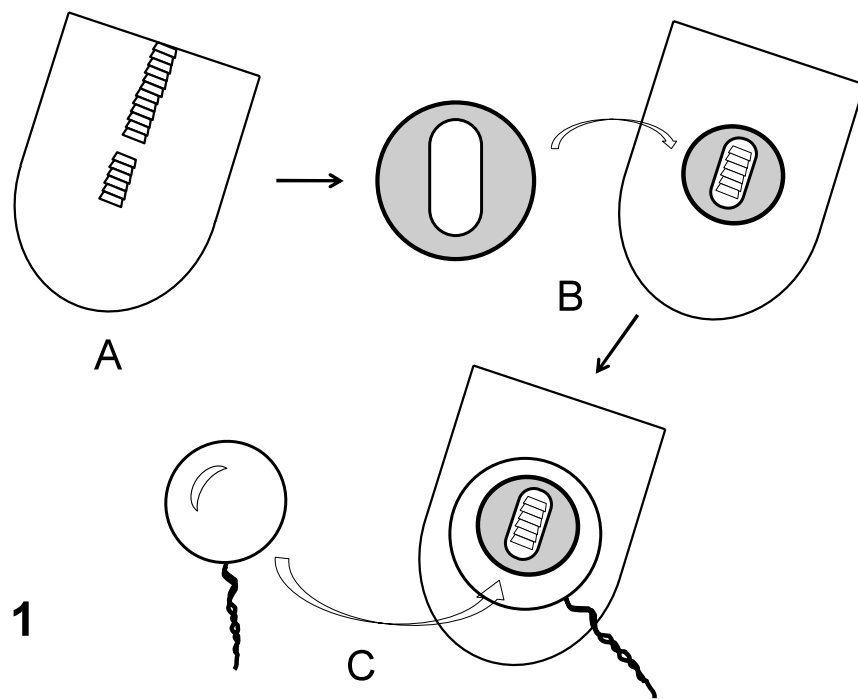
事前にメッシュの外径より一回り大きな白金ループ（白金線の直径0.1mm）を作っておき、このループにコロジオン膜を張っておく。すなわち、湿式法で水の上に2%コロジオンを滴下しコロジオン膜を作る。この上に白金ループを載せる。さらにその上からパラフィルムの保護紙を載せ、コロジオン膜と白金ループを回収する。この結果、コロジオン膜の張った白金ループを得ることができる。このループをナイフポート上の連続切片とスロットメッシュに張り付け、すくい取った。このようにして、コロジオン膜の張ったスロットメッシュ上に連続切片を回収することができたことになる（図1）。通常のようにスロットメッシュにコロジオン膜を貼り、これで直接連続切片をすくうこともできる。

## 結果と考察

移行期エナメル芽細胞層やその上方の乳頭層細胞層には多くのアポトーシス断片が認められ、その一部はマクロファージ、樹状細胞様の細胞や上皮細胞である乳頭層細胞内に取り込まれる。本観察でも、移行期エナメル芽細胞中にしばしば小胞の集団がみられた（図2）。この一部を拡大すると、ミトコンドリア様の細胞小器官が認められた（図3、矢印）。したがって、これはphagosomeで、アポトーシスを起こした移行期エナメル芽細胞の細胞断片を取り込んだ像と考えられた。これが本当に細胞内に取り込まれたことを確認するために連続超薄切片作成し、電子顕微鏡下に観察をした。この結果、図2中央に見られる細胞断片は約2  $\mu\text{m}$ の直径を持っているが、端から端までを連続切片で追うことができた（図3）。この結果、移行期エナメル芽細胞の中に細胞断片が存在することを明確に示すことができた。したがって、上皮細胞であるエナメル芽細胞がアポトーシス断片を貪食していることが明らかとなった。このような情報を得るためには、連続超薄切片法以外では、1000kV級の超高压電子顕微鏡を用いれば、0.5～3  $\mu\text{m}$ までの切片が観察できる。しかし、通常の施設では行うことができず、やや特殊である（日本電子顕微鏡学会関東支部、1982）。近年では電子顕微鏡断層撮影法（electron-microscope tomography）も細胞小器官の三次元画像の構築に有効であり、比較的小さな細胞小器官であれば美しい立体画像を得ることができる（Alberts et al., 2010）。しかし本研究で使われた比較的大きなアポトーシス断片の解析には連続超薄切片法の有効性は依然として高いと思われる。

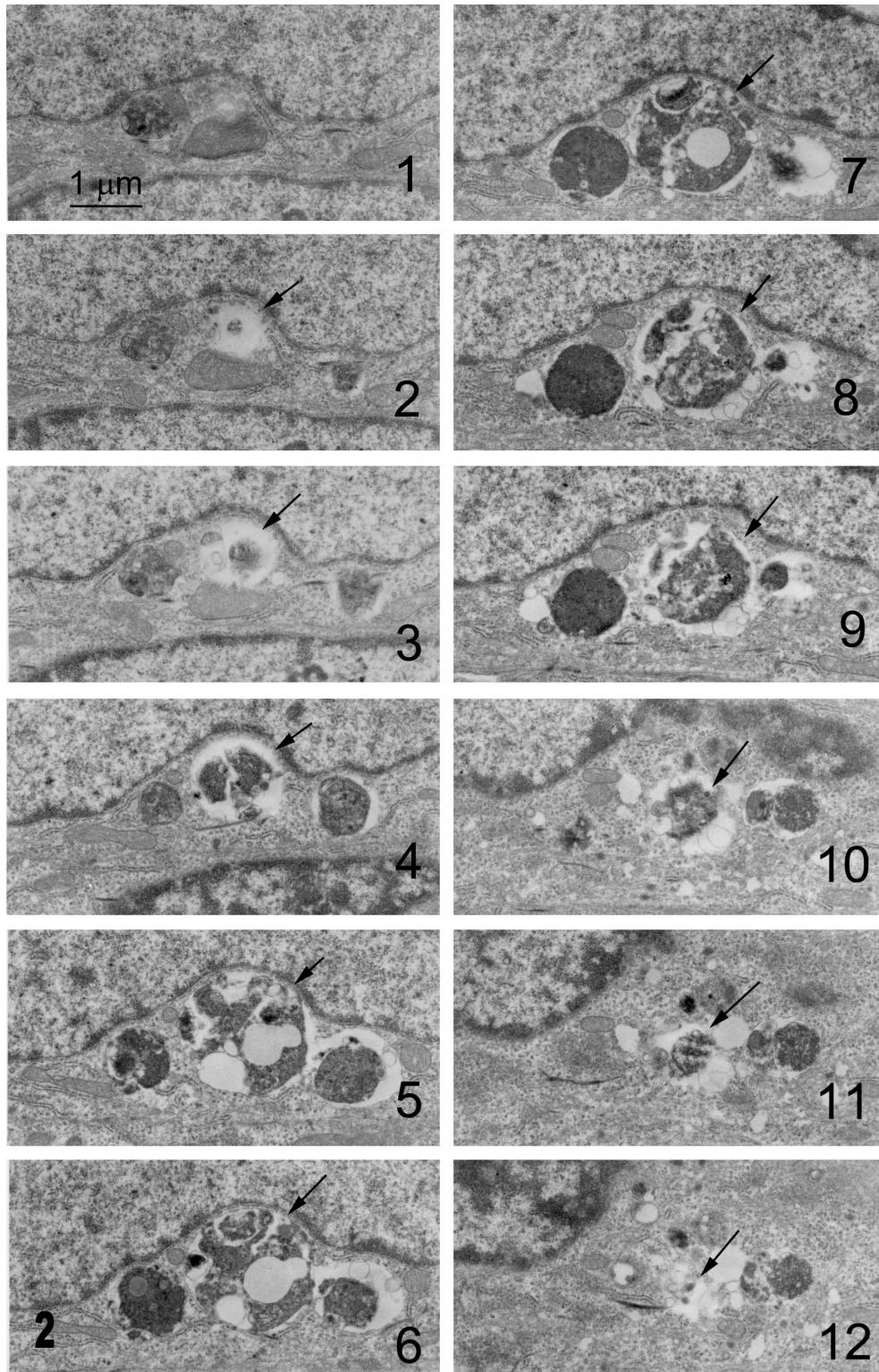
## 文献

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed, Garland, New York.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-257.
- 日本電子顕微鏡学会関東支部編（1982）医学・生物学 電子顕微鏡観察法、丸善、pp.285-291.
- Nishikawa S, Sasaki F (1995) DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts. *Histochem Cell Biol*, 104:151-159.
- Nishikawa S, Sasaki F (1996) The phagocytotic processing of ameloblast apoptotic bodies by distinct cells in the rat incisor: ingestion of cell debris by MHC class II-expressing cells. *J Histochem Cytochem*, 44:1459-1467.
- Smith CE, Warshawsky H (1977) Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec*, 187:63-98.



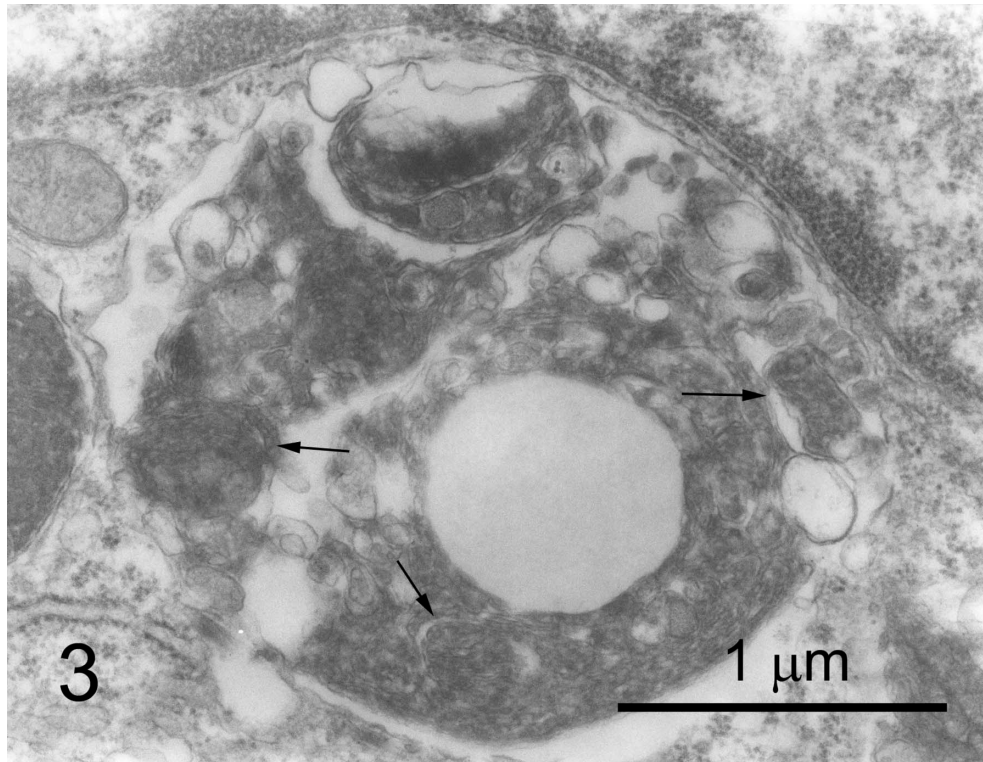
図の説明

- 図1. (A) ナイフボートの水面上の連続超薄切片。  
(B) 連続超薄切片の上にスロットメッシュを載せる。  
(C) 支持膜を張った白金ループで切片をメッシュごとすくい取る。乾燥させるとスロットメッシュの膜上に切片が残る。



図の説明

図2. ラット下顎切歯移行期エナメル芽細胞核付近の連続切片の同じ部分の写真を1枚おきから6枚おきの間隔で合計12枚並べたもの。1~2  $\mu\text{m}$ のアポトーシス断片が3つ見られる。中央のもの（矢印）は端から端まで、完全に連続切片中に入っている。Bar=1  $\mu\text{m}$ 。



図の説明

図3. 図2、写真7の中央の細胞断片の拡大。ミトコンドリア様の構造（矢印）がみられ、アポトーシス断片であることが推測できる。Bar=1  $\mu$ m。

---

西川純雄  
〒230-8501  
横浜市鶴見区鶴見2-1-3  
鶴見大学歯学部生物学的研究室

Sumio Nishikawa  
Department of Biology  
Tsurumi University School of Dental Medicine  
2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501  
E-mail: nishikawa-s@tsurumi-u.ac.jp