

細胞の変性と死

医療法人桂会平尾病院

中 村 忍

DEGENERATION AND DEATH OF CELLS

SHINOBU NAKAMURA

Medical Corporation Katsurakai Hirao Hospital

Received October 9, 2009

Abstract : 細胞は老化,あるいは物理的,化学的な傷害によって変性を起こすが,変性が進行し不可逆的な変化が生じた時点で死に至り,この後は死後の変化を辿る。この一連の過程がどのようなものであるか,未だ明らかになっていない。約半世紀以前から細胞採取法の開発が進み,これにより病変部位から新鮮な状態で細胞を得ることが可能になり,変性した細胞に基づいて作成された癌細胞の診断基準では判定しきれなくなってきた。細胞の変性過程を理解することは,臨床上,良,悪性細胞の診断を行う細胞診にとって極めて重要なことである。このような観点から細胞の変性過程を実験的に観察するとともに,細胞死についても検討を行った。その結果,新鮮な癌細胞では,これまで重要な判定基準であった核クロマチンの粗剛化は見られず,変性とともに出現することが分かった。細胞質と核の変性速度を比較すると,腺癌細胞では細胞質の変性が核の変性に比較して速く,一方扁平上皮癌細胞では逆の結果であった。良性細胞の変性速度は癌細胞に比較して速く,細胞種により細胞質と核の変性速度に差異がみられた。生理的あるいは突発的に起こる細胞死の形態学的観察では,細胞の自殺であるアポトーシスと事故死に相当するオンコーシスについて,実験結果を基に概説した。とくに色素排泄試験を用いた細胞死の検討では,色素排泄能の消失とともに細胞質の膨化が観察され,オンコーシスは細胞死を表す変化のひとつであると考えられた。細胞の変性,死,および死後の変化を理解するためには,丹念な形態学的観察が必要であることを強調した。

Key words : cell degeneration, cell death, apoptosis, oncosis, necrosis

1. はじめに

2009年7月にわが国では改正臓器移植法が成立し,2010年7月から施行される。「脳死をもって人の死とする」と定義付けをされたが,医学会でも未だ完全な同意は得られておらず,各分野で議論が続いている。人の死の基礎にあるのは言うまでもなく細胞の死である。1972年にKerr^らが細胞の死に方のひとつに「自殺」のあることを報告し,これをアポトーシス(apoptosis)と名付けて以来,細胞の死は俄かに注目を浴びることになった。細胞の死については,現在のところ細胞の機能,生体の維持に極めて重要な役割を果たしているアポトーシスに関心

が集中しているが,自殺以外の死にもある。また,何を持って細胞の死とするかについては明確な定義がなされていない。著者は,1970年より細胞の死とその前段階の一つである細胞変性について形態学的,生化学的に観察を行ってきた。

本稿では,これまでの研究を振り返りながら,細胞の変性と死について整理をしてみたい。

2. 細胞の変性と死

細胞に物理的あるいは化学的な傷害が加わると,細胞の機能に変化が起こり形態学的には変性像として観察することができる。細胞変性は傷害の程度により可逆的で

あつたり不可逆的であつたりする。可逆的であれば細胞の機能は回復し、不可逆的な場合には細胞は死に至り、以降は死後の変化を辿ることになる。この過程で観察される形態学的、生化学的変化は、傷害の内容や細胞の種類によって異なる。つまり、細胞の変性、死、死後変化には多様性があり、従つてこれらを詳細に観察し理解することは、細胞学の重要なテーマのひとつである。

3. 細胞の変性

細胞の変性とは、細胞が傷害を受けてから回復するまでか、あるいは不可逆的な変化により死に至るまでの過程を指す。つまり、変性に陥っている間、細胞は生きていくことになる。人の死と同じようにどの時点で細胞の死とするかが明らかになっていない現状では、どこから死後の変化と判断するかは極めて難しい。本稿では出来る限り死の時点を探るつもりではあるが、変性には死後の変化、つまり壊死(necrosis)も含まれる可能性も否定できない。

1) 実験的にみた細胞変性

1970年代に細胞診の自動化に向けての研究が盛んに行われた。細胞診では喀痰、体腔液、尿などの雑多な検体を取り扱うために、種々の程度に変性を受けた細胞を

観察することになる。また、細胞採取法の進歩により新鮮な状態の細胞を得ることが可能になり、パパニコロウ(Papanicolaou)²⁾が変性した細胞に基づいて作成し、広く用いられてきている癌細胞の形態学的診断基準では律しきれない細胞が出現するようになってきた。このような背景の下、新鮮な細胞の形態を知ると共に、変性によって細胞形態がどのように変化するかを把握しておく必要が生じた。このために実験的な基礎データを得ることが著者の研究の始まりであった。

比較的継代しやすいマウスエールリッヒ腹水癌細胞を用いて、未固定生の細胞を位相差顕微鏡下で経時的に観察すると共に各種染色を施して検討した³⁾。

採取直後の新鮮な状態の細胞を位相差顕微鏡下で観察すると、核縁は円滑一線であり、核内にはわずかな凝集塊と核小体を認める以外にほとんど構造が見られない。細胞質ではミトコンドリアなどの細胞内小器官は明瞭に観察できる。図1に示すように、時間の経過と共に核内には不規則な凝集塊が出現し、核縁は円滑さを失い不整になる。細胞辺縁には小さい突起(プリスター blister)が出没し、ミトコンドリアはわずかに膨化し、大きく見える。細胞質内には光輝性顆粒が出現するようになる。時間が経過し変性が進むと、核内の凝集塊はさらに大き

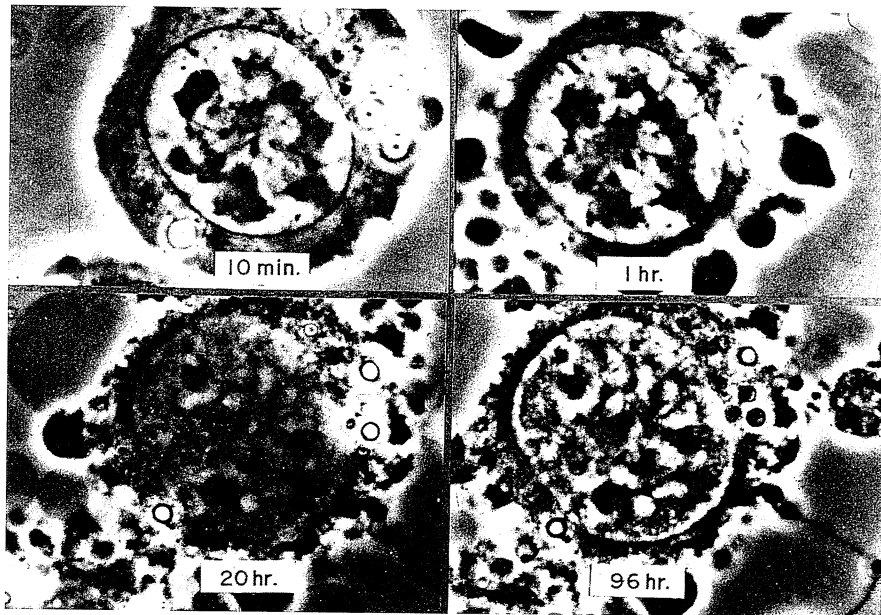


図1. エールリッヒ腹水癌細胞の変性過程(位相差顕微鏡)

37°C 位相差顕微鏡下で薄層標本内の同一細胞を経時的に観察した。

時間の経過とともに核内に不規則な凝集塊が出現する。細胞質にはプリスターが出没する。

min : 分, hr : 時間

く不規則になり、位相の差が明瞭になる。一方細胞質では、出射していたプリスターが消失すると同時に細胞質全体が膨化する。この時点で細胞の生死を観察するために参考になる色素排泄能は消失し、細胞は死んだと推定される。この後は死後の変化と考えられるが、細胞質の辺縁部は剥がれて細胞質は狭くなり、核内は位相の差が低下して核小体のみがみられるようになる。

細胞診断のための基本的な染色法であるパパニコロウ染色を施して観察すると、新鮮な状態では位相差顕微鏡所見に一致して核内に核小体とわずかな凝集塊を認めるのみであるが、時間の経過と共に核縁は不規則になり、核内には不整形で大型のクロマチン塊がみられるようになる。細胞質は狭小化し、このために核・細胞質比は大きくなる(図2)。

これらの結果から実験上、新鮮な細胞ではパパニコロウ

の癌細胞の形態学的診断基準となっている特徴(表1)は、細胞の変性と共に出現することが明らかになった。このことは細胞診断ではきわめて重要なことであり、新鮮な状態で細胞を観察する場合には従来の判定基準では癌細胞と判断できない細胞が出現する可能性を示している。

2) ヒト癌細胞および良性細胞の変性過程の比較

ヒトの癌細胞も基本的にはエールリッヒ腹水癌細胞と同じ過程を辿る^{4,5)}。しかし変性は速く、細胞種によって細胞質と核の変性速度に差異が見られる。表2に示すように、腺癌細胞の変性は比較的速く進み、細胞質の変性が先行する。つまり細胞質先行型の変性を示す(図3)。一方扁平上皮癌細胞では、変性は著しく緩慢であり、とくに細胞質の変性が極めて遅く核先行型の変性を示す(図4)。後述の細胞の死に方に当てはめると、細胞質先

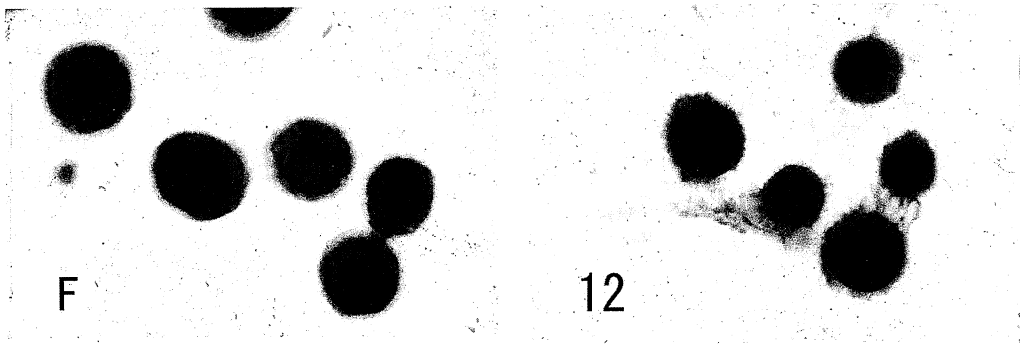


図2. エールリッヒ腹水癌細胞の変性過程(パパニコロウ染色)

37°C 無菌的に試験管内で保存した細胞のパパニコロウ染色所見。

時間の経過とともに不規則なクロマチン塊が出現する。細胞質は変性して狭くなり、核・細胞質比は大きくなる。

F: 新鮮細胞, 12: 12時間保存した細胞

表1. Papanicolaou が提唱した悪性細胞の形態学的判定基準(核, 細胞質)

1. 核の変化
 - 1) 核の不均衡な増大(核・細胞質比の増大)
 - 2) 核クロマチンの増量(hyperchromasia)
 - 3) 核の構造異常(不規則なクロマチンパターン, 核の切れ込み・分葉)
 - 4) 核小体の肥大および増加
 - 5) 核異型を伴った多核
 - 6) 異常な核分裂
 - 7) 異常空胞, 異常な核崩壊
2. 細胞質の変化
 - 1) 染色性の変化
 - 2) 細胞質内封入(色素顆粒, 細胞の崩壊物)
 - 3) 異常空胞

(文献2より作成)

表2. 細胞の種類と変性の差異

細胞の種類	変性の速度	細胞質と核の変性の速度
組織球	速い	ほぼ同時
中皮細胞	速い	ほぼ同時
腺腫細胞	速い	核先行
腺癌細胞	中程度	細胞質先行
扁平上皮癌細胞	遅い	核先行

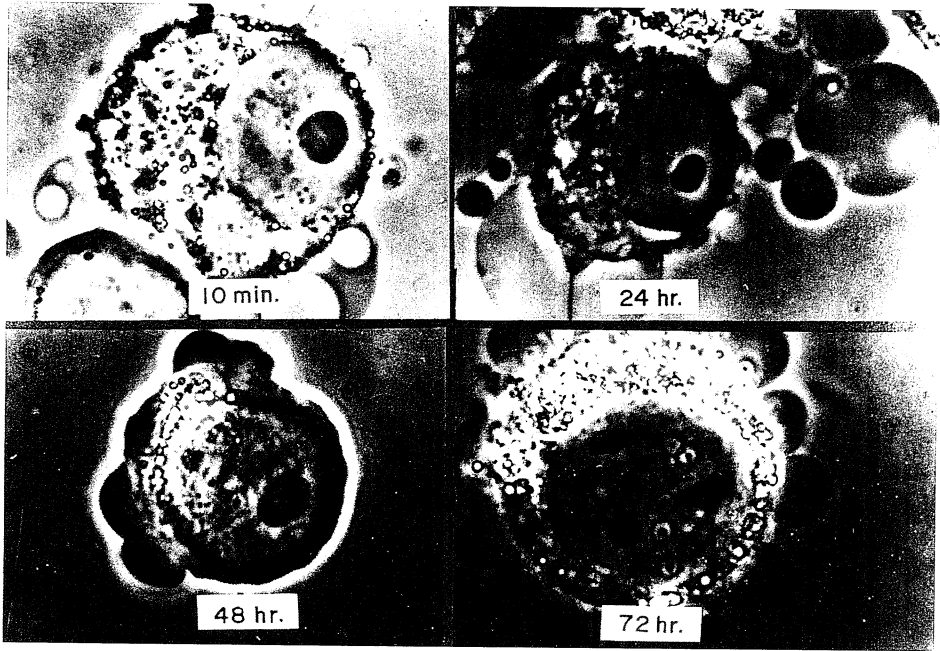


図3. ヒト腹水中の腺癌細胞の変性過程(位相差顕微鏡)
 37℃ 無菌的に試験管内に保存した細胞を経時的に観察した。
 エールリッヒ腹水癌細胞と同じように核内の凝集塊の出現, 細胞質のプリスターが観察される。
 min : 分, hr : 時間

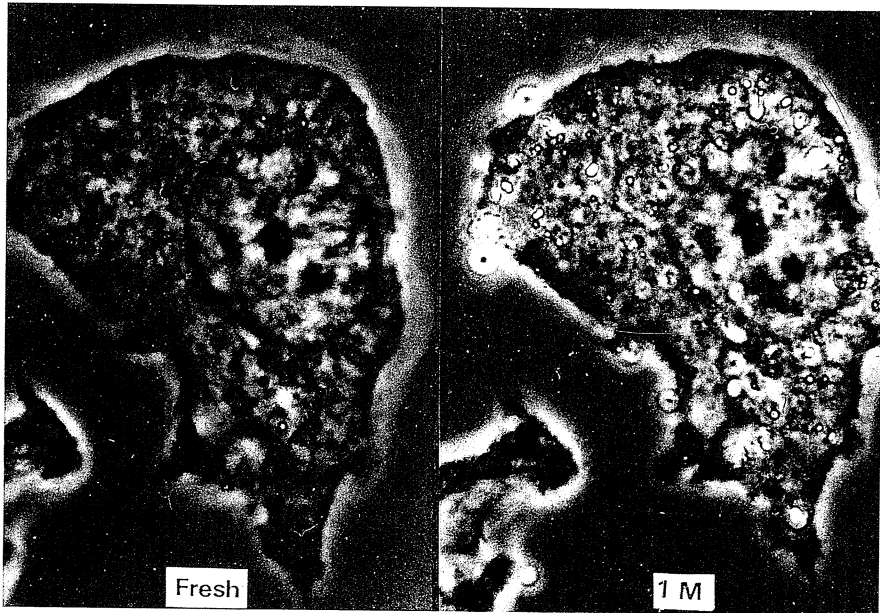


図4. ヒト胸水中の扁平上皮癌細胞の変性過程(位相差顕微鏡)
 37℃ 位相差顕微鏡下で薄層標本内の同一細胞を経時的に観察した。
 1 ヶ月におよぶ観察であるが, 細胞の変性速度は極めて遅く, 核に比較して細胞質の変性が遅れる。
 Fresh : 新鮮細胞, 1M : 1 ヶ月後の細胞

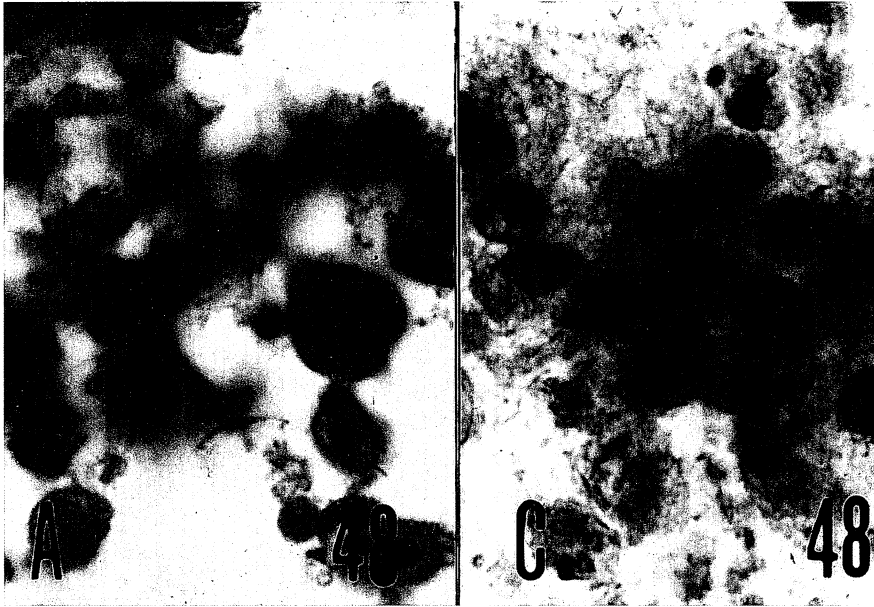


図5. ヒト大腸の腺腫細胞と腺癌細胞の変性過程の差異(パパニコロウ染色)
 腺腫(A): 48時間後には細胞質に比較して核の消失がみられる。
 腺癌(C): 48時間後には細胞質が変性消失し、核が残っている。

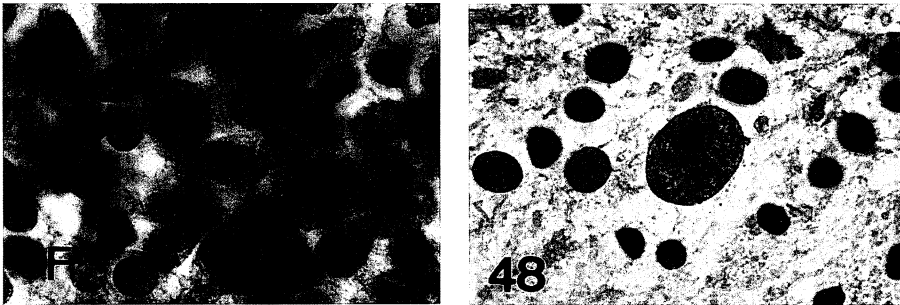


図6. ヒト胃癌細胞の変性(パパニコロウ染色)
 手術摘出組織を37°Cに無菌的に保存し、摘出直後(F)および48時間後(48)に捺印標本を作製して、パパニコロウ染色を施した。
 48時間後では細胞質は消失しているが、核が生きいきと観察できる。

行型はオンコーシス型、核先行型はアポトーシス型と言える。体腔液内の良性細胞である組織球や中皮細胞の変性は癌細胞に比較して速く進み、細胞質と核は同時かやや核が先行する変性を示すが、変性に伴って出現する核内の凝集塊は少なく小型で、癌細胞のそれとは異なる。このため変性しても核縁は円滑一線である。パパニコロウ染色所見でも同様の変化が見られ、変性が進むにつれて癌細胞と良性細胞との間に形態学的な差異が出現してくる。とくに重要なことは、新鮮な細胞では、癌細胞と

非癌細胞との間には診断に重要な役割を果たしている核所見に差が見られないことである。このことから、エールリッヒ腹水癌細胞で見られたように、パパニコロウの提唱した癌細胞の診断基準では診断不可能な細胞が出現することが明らかになった。

3) 診断困難な細胞における変性

良、悪性の診断が困難な細胞について、変性によって鑑別が可能になるか否かを検討した⁹⁾。用いたのはヒト大腸の高分化腺癌および中程度異型性を示す腺腫から得

られた細胞であり、両者は組織学的にも診断が難しい。この実験により腺腫細胞では、変性に伴い核の変性が先行する「核先行型」をとり、一方腺癌細胞では、細胞質の変性が先行する「細胞質先行型」の変性過程を取ることが分かった(図5)。このことは変性が加わるにより良、悪性の鑑別が容易になる可能性を示している。言い換えれば、細胞質の壊れた中に核が浮いて見えるときには癌細胞と考えられるが(図6)、細胞質は残っているものの核が崩壊して不明瞭になっている場合には良性細胞の可能性の高いことを表している。このような差異が生ずる理由として、細胞質内の自己融解性に作用する酵素の活性化の違い、細胞膜透過性の差、アポトーシス誘発機序の存在の有無など、種々の要因が考えられる。

4. 細胞の死

1)細胞の死の判定基準

細胞は変性を経るか、あるいは変性過程を経ずにいきなり死を迎える。何をもって細胞の死とするかの判定基準は未だ確立されていない。現在のところ生死判定の簡便な方法として、トリパンブルーあるいはエリスロシンBなどの色素の排泄が出来なくなった時点、つまり細胞が色素に染まった時をもって死とする色素排泄試験がある。また、アイソトープ(⁵¹Cr)を用いて⁵¹Crが細胞膜から離脱した時点をもって死と判定する⁵¹Cr放出試験もある。

細胞の死をどの時点とするか、つまり細胞の死の定義については、1960年から1970年にかけて精力的に研究された。中でもBesis⁶⁾はリンパ球の死への過程を位相差顕微鏡下で経時的に観察し、細胞の死戦期(the period of death agony)の形態学的特長として、①偽足あるいはブリスターの運動の変化、②細胞質の硬度の変化、③細胞膜の透過性亢進および変化、④細胞小器官の変化(ミトコンドリアの膨化など)、⑤核の変化(膨化、濃縮、破碎など)、を挙げている。この中でどの変化が直接細胞の死と結びつくのかは与えられた傷害により、また、細胞の種類によっても異なるために、ひとつに決めることは不可能であるとしている。さらにBesis⁶⁾は、形態学的に細胞死の基準を決めるのは困難であるが、外部環境に対応する能力が維持されなくなった時点をもって死とするのが一般的であり、この能力の有無は色素排泄試験によって判定するのが最も適切であると述べている。このように細胞死の判定基準を決めることは極めて難しい。

2)細胞の死に方

細胞の死に方にはふたつあることが分かっている。ひとつは細胞に備った死の機構を介した能動的な死であるアポトーシス(apoptosis)で、細胞の自殺と言えるもの

である。もうひとつは受動的な死であり、壊死(ネクローシス necrosis)と称されている。しかしMajno⁷⁾は、壊死とは本来細胞の死後の変化を指すものであり、死に方を表すものではなく、アポトーシスに対比する言葉として用いるのは適当ではないとし、アポトーシスに対応する言葉として、1910年に von Recklinghausen が虚血による骨細胞の膨化を報告した際に用いた「オンコーシス oncosis」(膨化を意味するギリシャ語である ónkos に由来する)を当てはめるべきである、と述べている(図7)。Majno^{7,8)}は、von Recklinghausen よりさらに以前の1859年出版のVirchowの「Cellular Pathology」の中の図に、名前は付けられていないが同じような細胞像が載っていると述べており、彼らの論文⁸⁾にその図が引用されている。先人達の観察力の鋭さには驚かされる。以下に

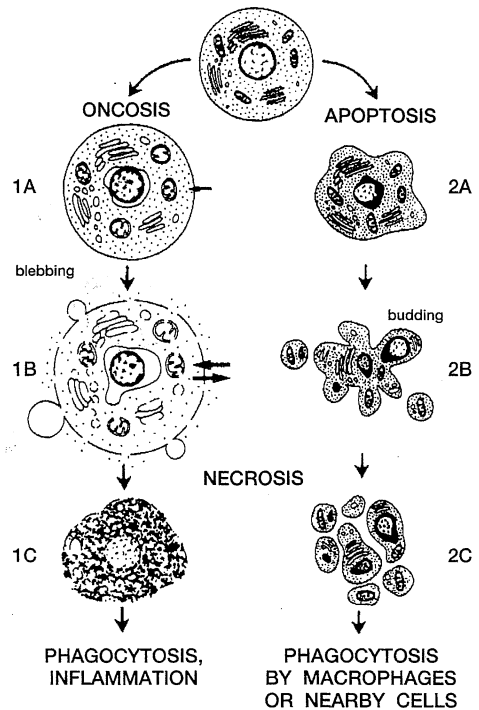


図7. 細胞の死に方と死後の変化
死に方は oncosis と apoptosis のふたつに分かれるが、死後は共に necrosis となる。
1 A : swelling, 1B : blebbing, 空胞形成, 透過性亢進
1 C : necrotic change (shrinkage, karyolysis, coagulation)
2 A : shrinkage, pyknosis, 2B : budding, karyorrhexis
2 C : necrotic change

(文献7より作成)

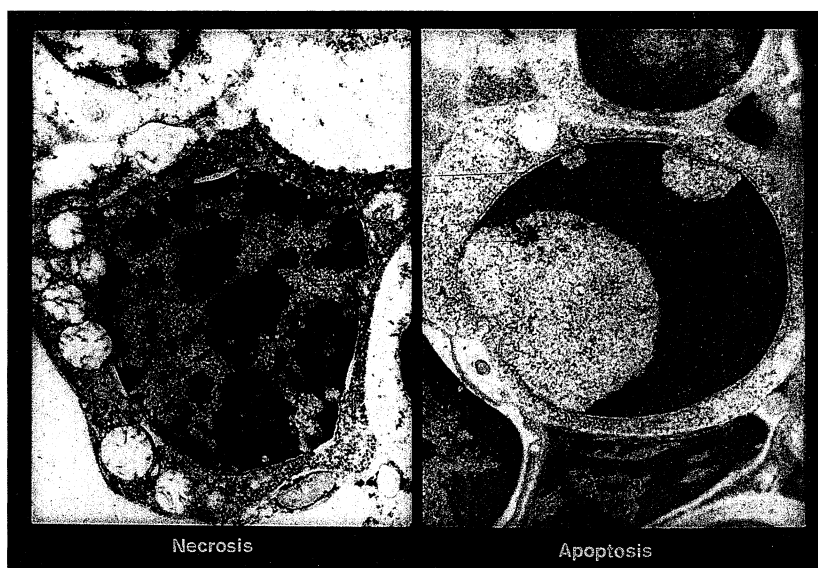


図8. ラット胸腺細胞のネクローシスとアポトーシスの電顕像
 ラットの胸腺を摘出して 37℃ に 24 時間無菌的に保存した細胞(Necrosis) :細胞質ではミトコンドリアの膨化が、核ではクロマチンの不規則な凝集がみられる。
 ラットの胸腺細胞に methylprednisolone を作用させて、アポトーシス (Apoptosis) を誘導した細胞:細胞質にはほとんど変化がないが、核にはアポトーシスに特徴的な三日月型のクロマチンの凝集がみられる。

それぞれについて著者らの実験成績を交えて解説する。

(1)アポトーシス

(i)アポトーシスの提唱

1972 年に Kerr ら¹⁾によって提唱された現象で、ギリシャ語の「花卉が落ちる」ことを表す言葉に由来している。細胞が有している死に至る機構を介する死であり、細胞の自殺に当る。Kerr らの報告後もアポトーシスへの関心は薄かったが、1980 年 Wyllie²⁾により、副腎皮質ホルモンを用いてリンパ球の死を誘導する際に、死んだリンパ球の核に特徴的なクロマチン凝集がみられ、このリンパ球から抽出した DNA を電気泳動するとエンドヌクレアーゼの活性化による規則的な二本鎖 DNA の切断を窺わせる ladder 形成が認められることが報告され、これが Kerr らの言うアポトーシスに相当することが明らかにされた。この報告以来アポトーシスは俄かに注目を浴び、医学のみならず多くの分野で研究が進められてきた。現在は専ら分子生物学的な面から研究がなされているが、このような経緯から、アポトーシスは本来形態学的基盤と生化学的基盤の両者に立った概念であることが分かる。

(ii)アポトーシスの特徴

形態学的特徴として、①境界明瞭な核クロマチンの凝集(図8)、②アポトーシス小体(apoptotic body)の形成、

③近接する貪食細胞によるアポトーシス細胞の処理、が挙げられる。とくに③により死んだ細胞は直ちに清掃されるために、アポトーシスは「クリーンな死」と称されている。これらの形態学的変化に対応する生化学的な特徴として、①エンドヌクレアーゼの活性化による DNA 二本鎖の切断、② DNA 電気泳動における 180 ~ 200base pair (bp) を単位とする ladder の出現、③これらの変化は、cycloheximide などの蛋白合成阻害剤やエンドヌクレアーゼ阻害剤である $ZnSO_4$ により抑制される(図9)、ことが挙げられる。従ってアポトーシスと判定する場合には形態学的変化と生化学的特徴が揃っている必要がある。著者らは「壊死」を観察する目的でラットの胸腺および脾臓を摘出して無菌的に放置するか、あるいは凍結、融解を繰り返す、形態学的に観察するとともに DNA を抽出して ladder 形成をみたが、形態学的には細胞は不規則な崩壊を示し、「壊死」を呈しているにも関わらず、アポトーシスに出現する ladder も観察された。このことから特徴のひとつをとらえてアポトーシスと判断するのは危険である。なおアポトーシスの検出法としては、これらの形態学および生化学的方法とともに、近年では細胞膜の構成成分である糖タンパク質の phosphatidylserine (PS) がアポトーシスと同時に細胞膜内側から外側に移

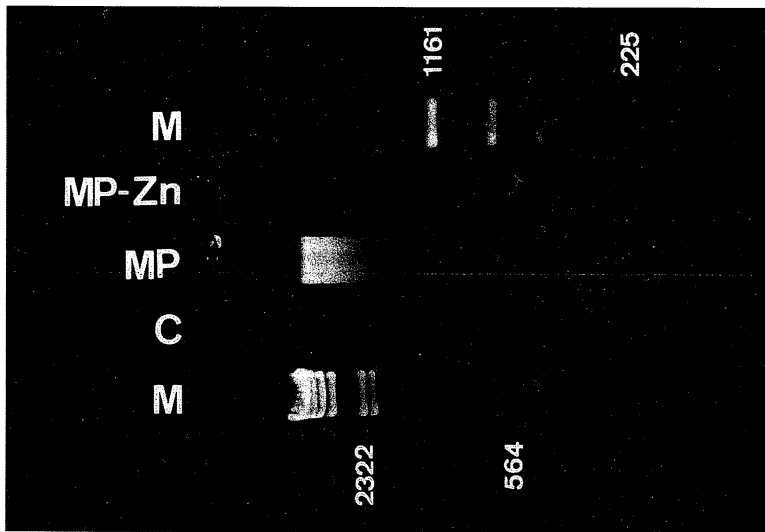


図9. Methylprednisolone を作用させたラット胸腺細胞のDNA 電気泳動
Methylprednisolone (MP) では約 200bp の ladder がみられるが、 $ZnSO_4$
(MP-Zn)を加えると ladder はみられない。
C：コントロール、M：マーカー

動することから、PS に親和性の強いタンパク質である annexin V を用いてアポトーシスを検出する方法が用いられている¹⁰⁾。また TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法¹¹⁾により免疫組織化学的にアポトーシス細胞を染色する方法もある。アポトーシス後に起こる変化については、細胞膜の崩壊にともない propidium iodide が核 DNA と結合するようになることを利用して検出する。

(iii) アポトーシスへの引き金と制御

アポトーシスは細胞および個体の老化と密接に関係している。約 30 億年前真核生物が生まれたが、この時に老化およびプログラム死の機構が備わり、その後生物の進化とともに保存されてきていると考えられる¹²⁾。細胞分裂、生殖により新たな細胞あるいは生物が生まれ出されるようになるとともに、細胞ならびに生物は新陳代謝を行う必要が生じ、老化および死の機構が備わったものと考えられる。生物は生と同時に死を獲得したことになる。したがってこのような現象を進化の面から研究するのも興味深い。

多くの研究により種々の現象にアポトーシスが関与していることが明らかになっている。これまでの研究をまとめると引き金として表3に示すようなものが挙げられる。この中で個体発生(昆虫などの変態、胎生期発育)および発達に関連するものは、時期が来ると細胞に本来備

わった死への機構が計画的に作動して自殺することから「programmed cell death」と称されている。これらの引き金が予定通り引かれなかったり、引かれても死の機構が正常に作動しなかったりすると、種々の奇形や疾患を起こす。

アポトーシスの制御がどのようになされているかについては未だ十分に解明されていないが、アポトーシスにおいては caspase family に属するタンパク質分解酵素の活性化が起こり、細胞の生命に不可欠な 300 を超える細胞タンパク質が切断されることが明らかになっている^{13, 14)}。とくに前述のように caspase により活性化したヌクレアーゼである CAD (caspase-activated DNase) はクロモゾーム DNA を 180 ~ 200bp のヌクレオゾーム単位に切断し、電気泳動上これに相当する ladder が観察できる。このような過程は複雑なシステムにより制御されて

表3. アポトーシスへの引き金

1. 個体発生(胎生期発育、昆虫などの変態)
2. 発達
3. 老化、寿命(恒常性維持)
4. 自己反応性 T 細胞の除去
5. 薬剤、ホルモン、サイトカイン
6. ウイルス(AIDS など)
7. 放射線
8. 環境

いて、これに関与する数多くの遺伝子が発見されている。とくに関係の深い遺伝子としては *bcl 2 family*, *ICE family*, *c-myc*, *p53* などが挙げられる。多くの関連遺伝子はアポトーシスについて促進的に、あるいは抑制的に働くが、これらは互いに関連性を保ちながら制御している。これらの遺伝子の発現には細胞内外からのシグナルが必要である。外からの入り口として Fas/Apo-1 抗原がある。本抗原は日本とドイツでほぼ同時に発見、クローニングされて、日本では Fas¹⁹⁾、ドイツでは APO-1¹⁹⁾ と名付けられた。TNF/NGF super family に属する細胞表面タンパク質であり、これをコードする遺伝子はヒト染色体では 10q23 に位置することが分かっており、本抗原に対するリガンドも明らかになっている。Fas/APO-1 抗原の発見以来アポトーシスに関する研究は飛躍的に進んだ。本抗原に対するモノクローナル抗体が作製され、これを利用して癌細胞にアポトーシスを誘導し効率よく制癌効果を上げる研究がなされた。著者ら^{17, 18)}は腫瘍細胞に Fas/APO-1 抗原を介する刺激 (IgM 抗 Fas モノクローナル抗体) とともに少量の抗腫瘍剤を投与することで、制がん効果の向上が期待できることを実験的に明らかにした。

アポトーシスは、細胞の死とともに死んだ細胞の周辺のマクロファージによる貪食、処理により完了する¹⁹⁾。死の機序の研究に比較して処理に関する研究はやや遅れている。しかし、最近貪食、処理に関する多くのリガンド、レセプターが発見され、これらの異常により全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの自己免疫疾患が起ることが実験的に明らかになってきている。この中で Nagata ら^{20, 21)}の見出した一部の活性化マクロファージが分泌する milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8) は、アポトーシス細胞の細胞膜外側に露出した phosphatidylserine (“eat me”シグナル) を認識し貪食へと至るが、この過程の異常がヒトの全身性エリテマトーデスの発症に関係していることが明らかになった²²⁾。さらに著者らの調べた全身性エリテマトーデスの患者の中に、MFG-E8 をコードする遺伝子に異常を持つものが見つ

っている。難病である全身性エリテマトーデスの発症予防、新たな治療法の開発につながるものと期待している。

(2) オンコーシス (oncosis)

アポトーシスが細胞の自殺とすれば、オンコーシスは他殺に当たる。Bessis⁶⁾はこれを accidental cell death (予期せぬ死)と呼んでいる。前述のように Majno ら⁷⁾は、アポトーシスに対応する言葉として壊死 (ネクローシス) が用いられているが、これは死後の形態学的変化を表現した言葉であり、死に方を表したのではないと述べている。さらに accidental cell death の最も典型的なものとして突然の血行杜絶、つまり虚血による細胞死があるが、これによって生ずる死の形態学的特徴は細胞の膨化であり、このことから壊死に替えて膨化を意味するオンコーシスを用いるべきであると提唱し、その定義として表 4 に示す項目を挙げている。

著者ら²³⁾は、かつてエールリッヒ腹水癌細胞をエリスロシン B とともに位相差顕微鏡下で経時的に観察した。その結果、細胞内に色素が侵入する瞬間 (核がわずかに赤く染まった時点) にそれまで出沒させていたプリスターから一転して細胞質全体が膨化し、水泡状になることが分かった。この変化はわずか数秒の間に起こり、いかにも細胞の破綻による変化を窺わせる。この時には核も位相の差を減ずる。このような変化が通常細胞を観察する際に用いられる染色法であるパパニコロウ染色ではどのように見えるかを検討するために、位相差顕微鏡下で観察した各変性段階の細胞を凍結固定し、染色を施して検討した。色素侵入のない時点、つまり生きていると考えられるものでは、染色像でもよく構造が保存されており位相差像との対比は可能であった。色素が核内にわずかに侵入した死の直後と考えられる時点では、核は対比できたが細胞質はほとんど対比できなかった。さらに細胞全体が色素で染まるようになると細胞質、核ともに染色上構造が不明瞭になり、全く対比できなくなった (図 10)。このように細胞質の膨化とともに色素排泄能が消失し、形態上は細胞質の構造の崩壊が核のそれよりも先行する

表 4. オンコーシス (oncosis) の定義

1. 細胞質の膨化 (swelling), 細胞内小器官の膨化, blebbing, 細胞膜の透過性亢進
2. 1 の変化は細胞膜のイオンポンプの障害に基づく
3. 2 の変化は一般的には虚血あるいは毒性をもつ物質によって起こり, ATP 産生障害などに基づく
4. 24 時間以内に壊死へと変化する
5. 通常核融解 (karyolysis) を呈している
6. 色素排泄試験などで細胞膜の透過性の変化が確認される
7. DNA は不規則に壊れる
8. 以上の細胞の変化は通常の組織学的 (細胞学的) な方法で推定できる

(文献 7 より作成)

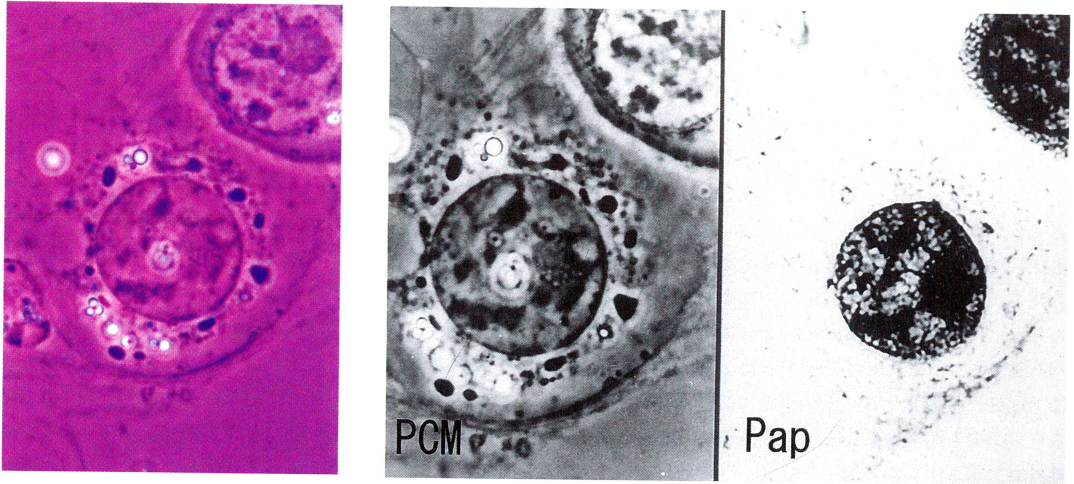


図 10. エールリッヒ腹水癌細胞のエリスロシン B を用いた色素排泄試験
 左：核がわずかに赤く染まった段階の細胞でも，細胞質は膨化して空胞形成がみられる。
 右：この時点で凍結溶解法により同一細胞にパパニコロウ染色 (Pap) を施して比較すると，核の構造は位相差像 (PCM) とよく対比できるが，細胞質は対比できない。右上のエリスロシン B で染まっていない細胞は，細胞質，核ともによく対比できる。

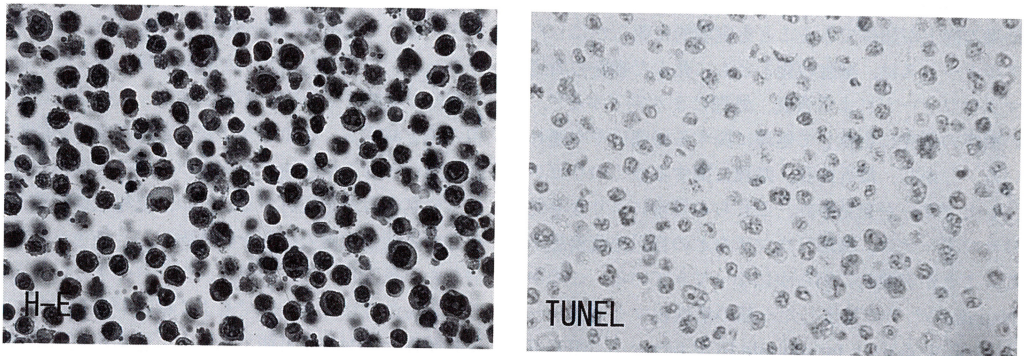


図 11. 室温に 3 時間放置したエールリッヒ腹水癌細胞
 H-E (hematoxylin-eosin 染色) では細胞の膨化がみられるが，アポトーシス細胞はみられず，TUNEL 法でも全く染まらない。

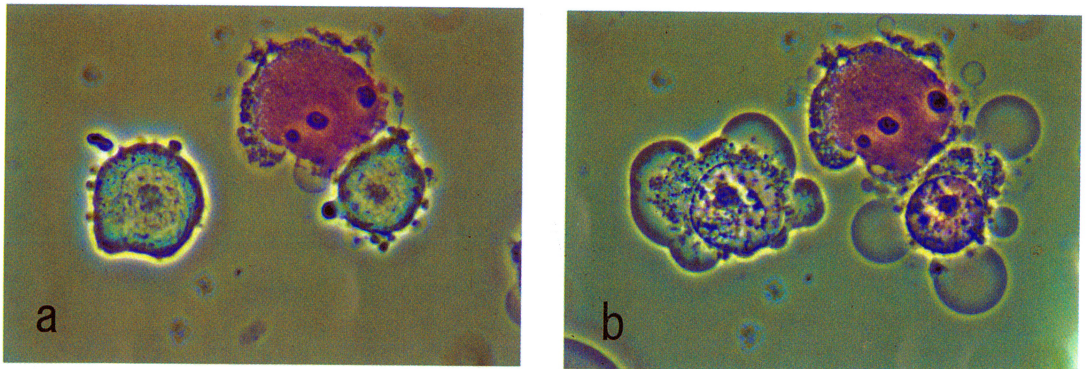


図 12. HL60 細胞のエリスロシン B を用いた色素排泄試験
 a：膨化した細胞は赤く染まり，すでに死んでいる。ほかのふたつは小さなブリストアを出させているが色素には染まらず，生きていると考えられる。
 b：細胞質の膨化とともに核に色素が侵入する。細胞質の膨化と色素の侵入は瞬時に起こる。

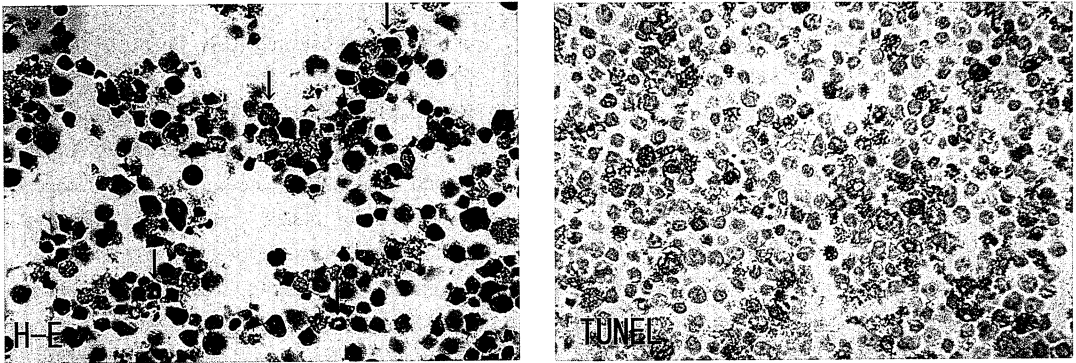


図 13. 室温に 3 時間放置した HL60 細胞
H-E (hematoxylin-eosin 染色) では膨化した細胞に混じってアポトーシスを窺わせる細胞(↓)がみられ、
TUNEL 法でも多くの陽性細胞が認められる。

ことが分かった。以上の実験は 1970 年代に行ったものであり、当時はアポトーシスの概念はほとんど知られていなかったためにこれ以上の実験は行わなかった。その後アポトーシスの研究が盛んになり、これらの時点の細胞について改めてアポトーシス細胞を識別する TUNEL 法を行ってみると全く染まらず(図 11)、アポトーシスではないと考えられた。さらに、培養白血病細胞である HL60 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、エールリッヒ腹水癌細胞にみられたのと同じようなオンコーシスと考えられる細胞質の膨化が観察された(図 12)⁹⁾。これらのことから、細胞が死んだ瞬間に核内に色素が侵入し、同時に細胞膜の透過性が変化して、急速に細胞外液が侵入して細胞質の水泡状の変化や、小器官の膨化、核の位相の差の減少などが生ずるのではないかと推定される。一方 HL60 細胞について同じように TUNEL 法を行うと多くの陽性細胞がみられ(図 13)、エールリッヒ腹水癌細胞とは異なる結果であった。このことから、細胞の死に方は、細胞種によって異なると考えられた。以上の結果は、Majno らの言うオンコーシスが細胞の死に方のひとつであることを裏付けるものであると考えられる。

(3) 細胞の死後の変化—壊死(necrosis)

壊死は、細胞の死後の変化を指す。細胞の死に方によりアポトーシスにより死んだ後の変化を post-apoptotic necrosis と呼び、虚血によるオンコーシスによって死んだ場合には ischemic necrosis と称することもある。アポトーシスで死んだ細胞は小さく分割されてアポトーシス小体となり、生体内ではマクロファージによって速やかに貪食、処理されるが、試験管内では処理機構がないので、アポトーシス小体は萎縮、硬化、融解して消失する。一

方オンコーシスで死んだ細胞は浮腫状に膨化し、やがて柔軟性を失い萎縮状になり硬化(coagulation あるいは rigidification)し、核も融解する(karyolysis)^{6, 7)}。生体内では、この状態になるとマクロファージにより貪食されるか、炎症の過程で処理される。試験管内では、細胞は融解状となり形を留めなくなる。このように細胞の死後の変化は細胞の置かれている環境により異なるが、基本的には同じような経過を辿る。

5. おわりに

細胞の変性、死、死後の変化についてとくに形態学的な観点から述べたが、死の判定が正確になされない限り完全に理解することは不可能である。しかし、これらを詳細に観察すると良、悪性あるいは組織型などの細胞の種類、置かれている環境、傷害の種類、その他種々の要因により、異なった変性過程を辿り、異なった死に方をし、死後の変化へと移ることが分かる。これらのことを念頭に置きながら細胞を観察することにより、より詳細に細胞所見を読み取ることができるようになるであろう。また、一世紀以上も前の十分な観察手段を持たない時代に、すでに多くの先人が現代の研究者も及ばない正確な観察をしていたことには驚かされる。地道に丹念に細胞を観察することで、残された多くの課題で解決の糸口が見出されるのではないかと考える。

文 献

- 1) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.

- J. Cancer **26** : 239-257, 1972.
- 2) Papanicolaou, G.N. : Atlas of Exfoliative Cytology. 4th ed., Cambridge, Harvard Univ. Press, 1963.
 - 3) 中村 忍 : がん細胞の変性過程における形態学的研究—エールリッヒ腹水がん細胞の核の変性過程について—。十全医会誌 **83** : 749-774, 1974.
 - 4) Nakamura, S. : Morphological studies on the degeneration process of cancer cells. Mitteilungsdiensdt der GBK. **55** : 94-97, 1989.
 - 5) 中村 忍 : 細胞の変性と死。細胞診の基本 上巻 総説、田嶋基男編集。pp75-81, 1998.
 - 6) Besis, M. : IV. General comments on senescence and death of blood cells. Living Blood Cells and their Ultrastructure. Translated by Weed, R.I., pp52-84, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1973.
 - 7) Majno, G. and Joris, I. : Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am. J. Pathol. **146** : 3-15, 1995.
 - 8) Majno, G., Gattuta, M.L. and Thompson, T.E. : Cellular death and necrosis : chemical, physical and morphologic changes in rat liver. Virchows Arch. Path. Anat. **333** : 421-465, 1960.
 - 9) Wyllie, A.H. : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature **284** : 555-556, 1980.
 - 10) Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. : Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. **148** : 2207-2216, 1992.
 - 11) 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.
 - 12) Clark, W.R. : A Means of an End — The Biological Basis of Aging and Death (生命はどのようにして死を獲得したか—老化と加齢のサイエンス). 小浪紀子訳、共立出版、東京、2003.
 - 13) Adams, J.M. : Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev. **17** : 2481-2495, 2003.
 - 14) Fischer, U., Jänicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. : Many cuts to ruin: a comprehensive uptake of caspase substrates. Cell Death Differ. **10** : 76-100, 2003.
 - 15) Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S. : The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell **66** : 233-243, 1991.
 - 16) Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. : Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science **245** : 301-305, 1989.
 - 17) Nakamura, S., Takeshima, M., Nakamura, Y., Ohtake, S. and Matsuda, T. : Induction of apoptosis in HL60 leukemic cells by anticancer drugs in combination with anti-Fas monoclonal antibody. Anticancer Res. **17** : 173-180, 1997.
 - 18) Nakamura, S., Takeshima, M., Nakamura, Y., Ohtake, S. and Matsuda, T. : Anti-Fas IgM monoclonal antibody enhances apoptosis induced by low-dose cytosine arabinoside. Anticancer Res. **19** : 197-204, 1999.
 - 19) Nagata, S. : DNA degradation in development and programmed cell death. Annu. Rev. Immunol. **23** : 853-875, 2005.
 - 20) Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. and Nagata, S. : Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature **417** : 182-187, 2002.
 - 21) Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M. and Nagata, S. : Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. Eur. J. Immunol. **34** : 1414-1422, 2004.
 - 22) Yamaguchi, H., Takagi, J., Miyamae, T., Yokota, S., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohshima, S., Naka, T. and Nagata, S. : Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. J. Leukoc. Biol. **83** : 1300-1307, 2008.
 - 23) 中村 忍, 吉田 喬, 服部 絢一, 谷本 一夫 : 細胞の死に至る過程の形態学的研究。最新医学 **32** : 165-169, 1977.