

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—

平井 滋夫

昨今の細胞死研究において、核の DNA 断片化を検出する TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (以下 TUNEL) 法で陽性死細胞の中には形態学的に“アポトーシス様”と判定される死細胞だけでなく“非アポトーシス様”と判定される死細胞も存在していることが明らかとなってきた。本研究は内耳形態変化が最も多く“自然細胞死”が高頻度に発現すると考えられる胎生12日目マウスの内耳を材料として、個体発生における“プログラム細胞死”で“アポトーシス様”と“非アポトーシス様”と判定される死細胞の占める比率を明らかにし、内耳毒性を有する cis-diammine-dichloroplatinum (以下 CDDP) 投与の影響を観察した。対照群5匹5耳と CDDP 負荷群 (以下 CDDP 群) 5匹5耳で観察された TUNEL 陽性死細胞を“アポトーシス”の定義に基づいて、光顕的にアポトーシス細胞死 (以下 ACD) と非アポトーシス細胞死 (以下 NACD) を示す死細胞に分類し、各検体における総死細胞数に対する比率 (以下 ACD 率, NACD 率) を算出した。その結果、対照群における ACD 率は約90%であり、NACD 率は約10%であった。また CDDP 群では対照群と比較して総死細胞数に著変は無かったが、前者が約70%、後者が約30%と発現率に変化が認められた。それによって ACD は分裂・増殖と同様に発生期に必須であり、NACD の増加は内耳毒性に対する防御反応と推察された。 (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 — CDDP-induced Change —

Shigeo HIRAI

In the recent studies of cell death, dying cells judged by the TdT-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) method have been classified into “apoptotic” and “non-apoptotic” cells. In this study, 12-day-old mouse embryos were used. The percentage of “apoptotic” and “non-apoptotic” cells among total dying cells in inner ear were calculated, and the effects on inner ear’s cell death of cis-diammine-dichloroplatinum (CDDP) were examined. Five inner ears from normal embryonic mice (Control group) and five inner ears from CDDP treated embryonic mice (CDDP group) were used. TUNEL positive dying cells occurring in apoptotic cell death (ACD) and non-apoptotic cell death (NACD) were classified by light microscopy, and the numbers in ACD and NACD in the whole inner ear were counted. About 90% of the inner ear dying cells of the Control group were ACD and about 10% were NACD. About 70% of the inner ear dying cells in the CDDP

group were ACD and about 30% were NACD. It was suggested that ACD essential to development of inner ear, and increased NACD might be defensive phenomenon against CDDP toxicity.

(Accepted on October 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(4): 287-296, 2002

Key Words ① Apoptosis ② Non-apoptotic cell death ③ Inner ear
④ Mouse embryo ⑤ TUNEL method

はじめに

昨今の細胞死研究では、*in vitro* での研究が盛んに行われ細胞死におけるメカニズムについて多くの事象が解明されてきた^{1)~9)}。それらはアポトーシス^{10)~12)}と称され、遺伝子による制御を受けて生体にとって不要となった細胞を除去するための生理的なものとして知られている¹³⁾。しかしそれらの多くは生体から取り出された後の *in vitro* での観察が主体であり、さらに細胞死を誘導するための薬剤投与やレセプターを介した強制的な細胞死シグナル導入等が施された人為的な“誘導細胞死”であって決して生理的なものとは言えない。それに対して、生理的と言える細胞死誘導のない *in vivo* での研究は少なく、“自然細胞死”のプロセスにおいては不明な点が多いのが現状である。

アポトーシス^{10)~12)}とは Kerr¹⁰⁾が透過型電子顕微鏡（以下電顕）観察によって発見した「細胞縮小・核凝縮」という形態学的条件と、その後 Wyllie^{11), 12)}が電気泳動で発見した「DNA断片化」という生化学的条件の両者を満たすものとされている。その後、アポトーシス^{10)~12)}のDNA断片化を光学顕微鏡によって検出する TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling（以下 TUNEL）法¹⁴⁾が大変注目されたため、その顕微鏡観察が頻繁に行われた^{15)~31)}が、それらの報告の多くは TUNEL 陽性死細胞をすべてアポトーシス^{10)~12)}とし、その形態学的特徴を軽視する傾向にある。ところが、顕微鏡的に TUNEL 陽性でプログラム細胞死と判定されてもアポトーシス^{10)~12)}の生化学的な条件は満たしているが、形態学的な条件を満たしていないものも存在していることが明らかとなってきた。すなわち、

アポトーシス^{10)~12)}はプログラム細胞死の一型ではあるが、すべてではないというのが今日の通説である³²⁾。一方、内耳毒性を有する cis-diammine-dichloroplatinum（以下 CDDP）は *in vitro* でのアポトーシス^{10)~12)}を誘導する^{33)~35)}と言われており、*in vivo* でも内耳における死細胞を増加させるという報告³⁶⁾が存在する。しかし、胎生期内耳における報告は無く、生理的に発現している“自然細胞死”に対する CDDP の細胞死誘導の影響については不明である。

以上のことより本研究は、内耳形態変化が最も急速に進行し³⁷⁾“自然細胞死”が高頻度に発現すると考えられる胎生12日目マウスの内耳を材料として、TUNEL 陽性死細胞を顕微鏡的にアポトーシス細胞死（以下 ACD）と非アポトーシス細胞死（以下 NACD）に分類し、内耳全体における総死細胞数に対する比率（以下 ACD 率、NACD 率）および CDDP 負荷による影響を明らかにすることを目的とする。

材料と方法

動物は ICR マウス胎生12日目の内耳で、対照群 5 匹 5 耳、CDDP 負荷群（以下 CDDP 群）5 匹 5 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（ブリプラチン®、ブリストル社製）を 2.0mg/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 投与量を決定するにあたり、投与濃度希釈系列（1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/kg/day）で各濃度につき妊

娠マウスを3匹とし、胎児への影響を確認した。これらの中で3匹とも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である2.0 mg/kg/dayを今回の実験の投与量とした。各群ともに妊娠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、頭部を4%パラホルムアルデヒド液で4℃にて4時間固定しアルコール系列で脱水後、パラフィン包埋した。内耳の全範囲を正確に切片化するために1) HE染色用プレパラート 2) TUNEL染色用プレパラートを準備し、内耳全体を十分に含む範囲で水平断連続採取された3 μ m厚の切片を交互に1), 2)に載せ、1)と2)を連続対応させた。1)はすべてHE染色し全体像を連続して観察可能な一側耳を選択して、2)のうち同側耳に連続対応するものを実際にTUNEL染色し、1耳あたり約180切片を作製した。このように連続切片化した各群合計10耳をすべて脱パラフィンし、リン酸緩衝生理食塩水(以下PBS, pH7.4)で4回洗浄後、TUNEL偽陽性発色する内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために、室温で30分間0.3%過酸化水素水(99%メタノール)に浸漬した。その後PBSで4回洗浄しTUNEL反応液(In Situ Cell Detection Kit POD, Roshe Diagnostics社製)中で60分間37℃で反応させ、さらに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, Roshe Diagnostics社製)中で30分間37℃で反応させた。続いて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, ニチレイ社製)中で2分間発色させ光顕的に観察した。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陰性を確認した。対照群5耳およびCDDP群5耳それぞれの内耳全体における1) ACD数, 2) NACD数, 3) 総死細胞数(ACD数+NACD数)をカウントし, 4) ACD率, 5) NACD率を算出した。ACD率, NACD率の5耳平均値の各群間の差

についてt検定を用いて統計学的検討を行った。〈アポトーシスと非アポトーシスとの判別〉

アポトーシス^{10)~12)}はKerr¹⁰⁾が発見した「細胞縮小・核凝縮」という形態学的条件と、Wyllie^{11), 12)}が発見した「DNA断片化」という生化学的条件の両者を満たすものである。さらに核凝縮とは核が縮小し、かつ核クロマチンが凝集・辺縁化すること³²⁾であり、TUNEL光顕像でもその辺縁化した核クロマチン部位が三日月状やリング状に濃染される¹⁴⁾。これらの形態学的特徴に注目してTUNEL陽性死細胞の光顕的分類を行った結果、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はACD(Fig. 1A, a)と定義した。また、三日月状あるいはリング状濃染を呈さず均一な染色像であるが、正常核と比較して明らかな核濃縮を呈し辺縁整で正円形のものも、観察軸に対して垂直方向にクロマチンの辺縁化を来した場合と考えて同様にACDとした。一方、核染色陽性であっても核が正円形を呈さず変形し、三日月状あるいはリング状の濃染部を認めないものはNACD(Fig. 1B, b)と定義した。なお、染色性の弱いものや1 μ m以下のもの、あるいは内因性ペルオキシダーゼ不活性化が不十分などの理由で核以外の細胞質等が染色されたと思われるもの、すなわち染色陽性であっても核形態が明瞭でないものは除外した。

本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No.01-031)、川崎医科大学動物指針に基づいて実施された。

成 績

胎生12日目マウスの内耳では蝸牛部と前庭部は連続して腔を形成しており両者は一部位として卵球形囊部と称される。Figure 2に対照群とCDDP群それぞれの卵球形囊部例を示した。Aは対照群例、BはCDDP群例で、A、Bはほぼ同部位を対応させた。a、bはA、Bそれぞれの枠内の組織像を拡大したものであり、前述

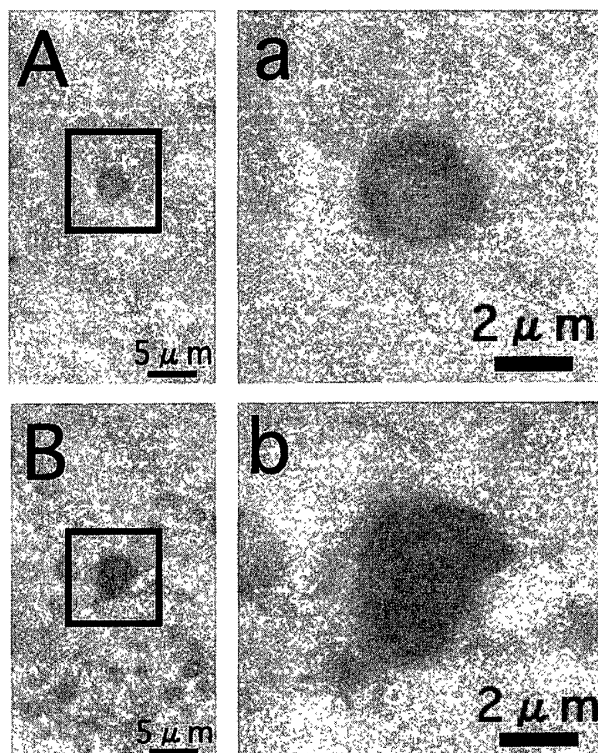


Fig. 1. TUNEL stained paraffin embedding 3 μ m sections. The auricle of the inner ear of 12-day-embryo mice observed light microscopically. The most striking and reliable characteristics of apoptotic and non-apoptotic cell death in Control group are shown.

A. Apoptotic cell death (ACD)

a. Micrograph of the framed area in A. The nucleus has complete round and strong staining area at the nuclear rim.

B. Non-apoptotic cell death (NACD)

b. Micrograph of the framed area in B. The nucleus is transformed and stains all over.

の定義を基に白矢頭で ACD である死細胞を、黒矢頭で NACD である死細胞を示した。このような判定基準で、1 耳あたり約 180 枚の連続切片で各群 5 耳ずつ合計 10 耳で、それぞれの個体別に内耳全体における 1) ACD 数、2) NACD 数、3) 総死細胞数 (ACD 数 + NACD 数)、4) ACD 率、5) NACD 率を算出すると、Table 1 に示すごとく、各項目の 5 耳平均値 \pm SD は 1) ACD 数では対照群 2719 ± 301 , CDDP 群 2087 ± 299 2) NACD 数では対照群 245 ± 119 , CDDP 群 755 ± 118 3) 総死細胞数では対照群 2965 ± 289 , CDDP 群 2842 ± 233 4) ACD 率では対照群 $91.7 \pm 4.2\%$, CDDP 群 $73.2 \pm 5.4\%$ 5) NACD 率では対照群 $8.3 \pm 4.2\%$, CDDP 群 $26.8 \pm 5.4\%$ であった。死細胞発現の

各群間の差を検討するために、死細胞数の比較よりも普遍的である死細胞発現率の比較を行った。その結果、Figure 3 に示すように ACD 率の 5 耳平均値については対照群 $91.7 \pm 4.2\%$, CDDP 群 $73.2 \pm 5.4\%$ で t 検定を行うと有意差を認め ($P < 0.001$), NACD 率についても対照群 $8.3 \pm 4.2\%$, CDDP 群 $26.8 \pm 5.4\%$ で有意差を認めた ($P < 0.001$)。また総死細胞数の 5 耳平均値については対照群 2965 ± 289 , CDDP 群 2842 ± 233 で有意差を認めなかった。したがって、CDDP 負荷によって内耳全体における総死細胞数を著変させることなく ACD の発現率が 91.7% から 73.2% に減少し、逆に NACD が 8.3% から 26.8% に増加した。

考 察

個体発生にともなう細胞死を電顕的に分類したものが Clarke³²⁾ によって提唱されている。彼は諸家の発生期細胞死の報告を分析した結果、死細胞を type 1, 2, 3A, 3B に四分類した。type 1 死細胞はアポトーシス^{10)~12)} を来したものであり早期に貪食処理される。type 2 死細胞は autophagic cell death^{38)~47)} 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し、クロマチンの凝集・辺縁化は見られない。細胞質には多量の自己貪食空胞を認め、死滅速度が遅く晩期に貪食され組織残存傾向が強い。type 3 A 死細胞は non-lysosomal disintegration^{32), 41)} 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 3 B 死細胞は cytoplasmic type of cell death^{33), 48)~50)} 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。本研究ではその光顕レベルでの形態学的特徴から ACD を示す死細胞はアポトーシス^{10)~12)} を来した Clarke³²⁾ の言う type 1 死細胞と同一と考え

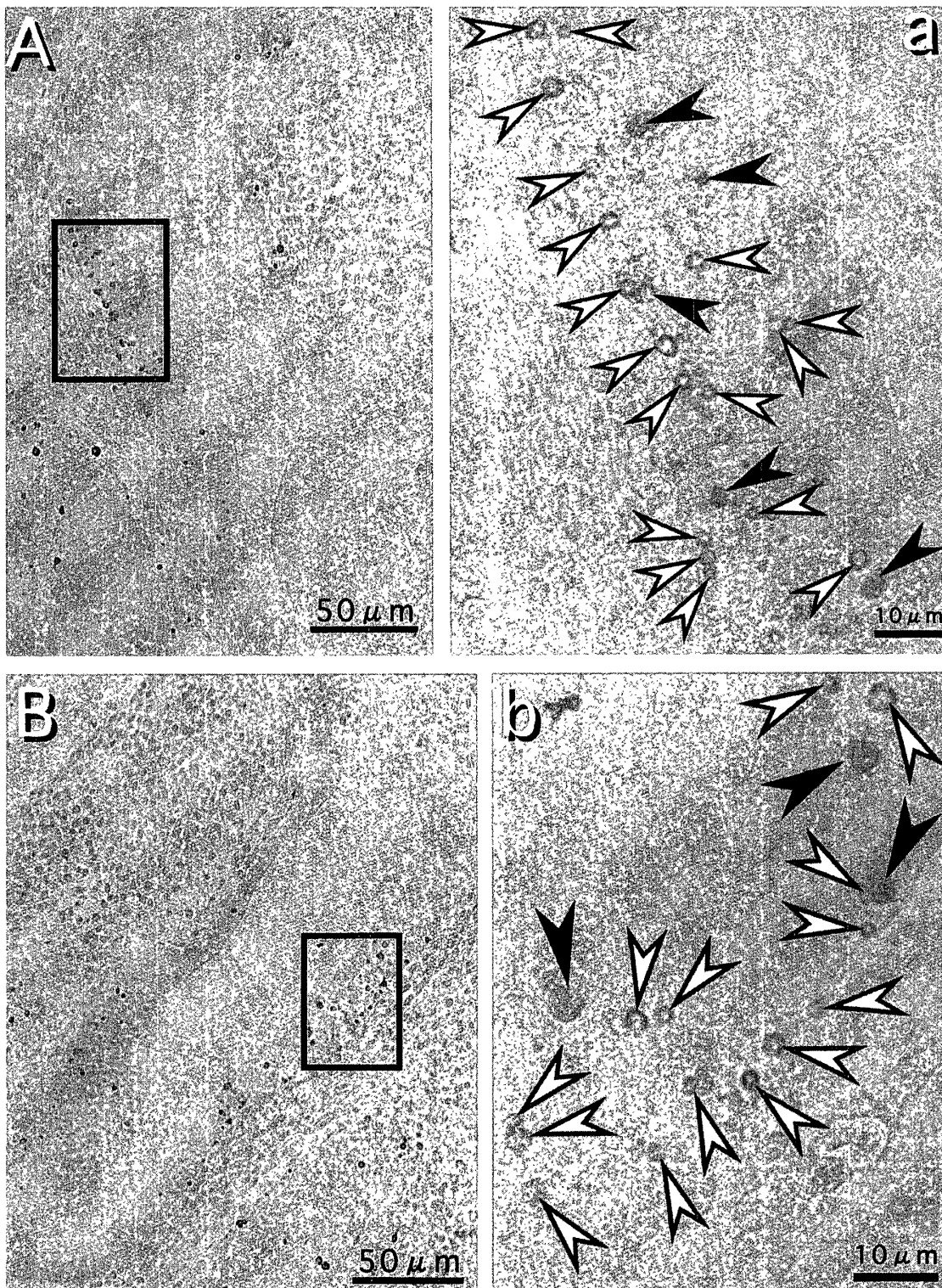


Fig. 2. TUNEL stained paraffin embedding $3\ \mu\text{m}$ sections. The utricle of the inner ear of 12-day-embryo mice observed light microscopically.

A. Control group

a. Micrograph of the framed area in A. TUNEL positive dying cells of ACD (white arrow heads) and NACD (black arrow heads).

B. CDDP group

b. Micrograph of the framed area in B. TUNEL positive dying cells of ACD (white arrow heads) and NACD (black arrow heads).

Table 1. The numbers of dying cells of ACD, NACD, total dying cells, and their mean \pm SD in control and CDDP groups. The percentages of their numbers of dying cells among the total dying cells, and their mean \pm SD are shown in parentheses.

	Control group			CDDP group		
	mouse	cell count	(%)	mouse	cell count	(%)
ACD	No.1	3185	(94.5%)	No.1	1918	(68.7%)
	No.2	2725	(92.8%)	No.2	1670	(67.9%)
	No.3	2762	(88.9%)	No.3	2208	(73.0%)
	No.4	2536	(96.3%)	No.4	2194	(75.1%)
	No.5	2389	(86.1%)	No.5	2447	(81.2%)
Mean \pm SD		2719 \pm 301	(91.7 \pm 4.2%)		2087 \pm 299	(73.2 \pm 5.4%)
NACD	No.1	187	(5.5%)	No.1	873	(31.3%)
	No.2	211	(7.2%)	No.2	791	(32.1%)
	No.3	345	(11.1%)	No.3	816	(27.0%)
	No.4	97	(3.7%)	No.4	728	(24.9%)
	No.5	386	(13.9%)	No.5	566	(18.8%)
Mean \pm SD		245 \pm 119	(8.3 \pm 4.2%)		755 \pm 118	(26.8 \pm 5.4%)
Total dying cells (ACD + NACD)	No.1	3372		No.1	2791	
	No.2	2936		No.2	2461	
	No.3	3107		No.3	3024	
	No.4	2633		No.4	2922	
	No.5	2775		No.5	3013	
Mean \pm SD		2965 \pm 289		2842 \pm 233		

られた。一方、NACDを示す死細胞は type 2, type 3 A, type 3 B 死細胞の三者が含まれると考えることができる。この三者の共通する特徴は貪食処理が早期に成される type 1 死細胞に対して遅い、あるいは貪食されないという点である。すなわち ACD を示す死細胞と比較して NACD を示す死細胞は死滅が遅延し組織残存傾向が強いと見える。本研究結果では、胎生期マウスの内耳は内耳毒性負荷によって、総死細胞数を著変させることなく ACD を示す死細胞の発現率を約20%減少させ、逆に NACD のそれを約20%増加させることが明らかとなった。つまり内耳毒性に対して、胎生期マウスの内耳は予定の総死細胞数を増加させず、その内訳として早期に死滅してしまう細胞を減少させ、その分だけ死滅が遅延する細胞を増加させているのであろう。ところで「死滅が遅延する」ことにどのような意味があるのであろうか。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^{51), 52)}。ACD を示す死細胞は短時間で死滅消失するため DNA 修復可能なものはほとんど無いと思われたが、NACD を示す死細胞は消

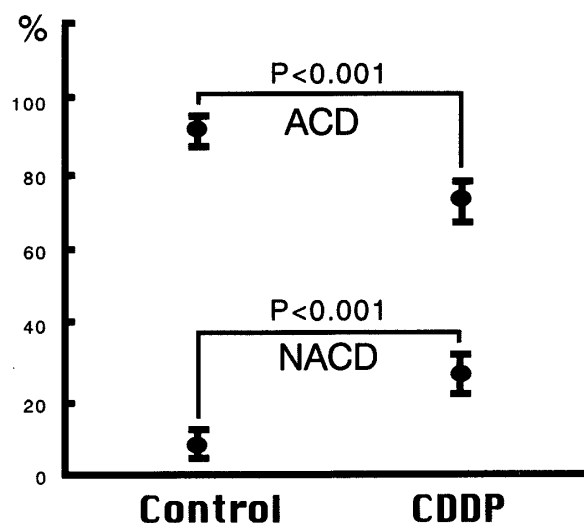


Fig. 3. The average percentages of dying cells of ACD and NACD among the total dying cells in the five inner ears of each group. Bars : S.D. There are significant differences between each group (t-test : $P < 0.001$, $n = 5$).

失までに長時間を有する³²⁾ため、その間に DNA が修復されるものはある程度存在すると考えられる。すなわち内耳毒性がもたらされると、元来 ACD の死滅様式を有し、将来死細胞となる予定の細胞の一部が死を免れ、残ったものだけが実際に ACD として死滅して分裂・増殖と協同して内耳の器官形成を担うと推察され

る。一方、ACD の実行が減少した分だけ、内耳毒性によって偶発的に DNA 損傷を来した細胞に NACD の死滅様式を誘導し、それが時間をかけて死滅するまでの間に損傷 DNA の修復を試みるのであろう。そして一部の細胞は実際に内耳毒性による損傷 DNA が修復されて生存を続けるが、最終的に損傷が大きく DNA 修復が不可能であった細胞が NACD を示す死細胞として TUNEL 光顕観察で検出されると考えられる。恐らく DNA 修復が不可能となった NACD の増加に対応して、生存細胞の発現量を決定することによって総死細胞数の著変を来さない様に調節しているのであろう。この一連の流れの中で胎生期マウスの内耳は総死細胞数をほとんど変化させず、その大多数を依然 ACD を示す死細胞としているため、内耳器形成もほぼ正常に実行され、形成不全等の発現を最小限に留めると推測できる。したがって「死滅が遅延する」ことはマウスの内耳器形成期における危機的状態に対する、個体維持のための防御反応として重要な意味があるといえる。危機的状態が軽度であれば個体維持は可能と考えられるが、極度になるとそれは不可能であろう。CDDP は容量依存的に内耳組織に障害をもたらすと言われているし⁵³⁾、本研究でも CDDP 負荷が高濃度 (2.5 mg/kg/day 以上) になると成長障害や流産を認めた。つまり過剰な内耳毒性負荷を行った場合には、ACD を示す死細胞の発現減少が顕著となり正常な器形成が成されず形成不全を生じる。さらには NACD を示す死細胞の DNA 損傷が強くなるため、その修復も無効となり、死細胞数は増加の一途をたどって内耳の脱落を来すものと推測された。最終的には内耳のみでなく多くの臓器の細胞が死滅し、個体維持は不可能となるであろう。*in vitro* において CDDP はアポトーシス^{10)~12)}を誘導するものとして知られている^{33)~35)}が、*in vivo* では成績に示したように異なる結果となった。その理由の一つには CDDP の内耳毒性に対する生体防御反応を挙げることが出来る。

本研究結果によって TUNEL 陽性死細胞には ACD と NACD を示すものがあり、CDDP 負荷によるその発現変化により、それぞれの存在意義も推測することができた。しかし、この分類は光顕観察によるものであり、特に NACD を示す死細胞は Clarke³²⁾の発生期細胞死の電顕分類における type2, 3A, 3B 死細胞を含んでおり、その解明としては不十分である。また細胞死に対する貪食処理は一般的にマクロファージあるいは隣接細胞が行うとされているが、本研究の TUNEL 光顕観察では分析不可能であった。

結 語

- 1) 胎生期マウス内耳の“自然細胞死”にはアポトーシス細胞死 (ACD) と非アポトーシス細胞死 (NACD) が存在し、内耳全体の総死細胞数のうち ACD を示す死細胞は約90%、約10%は NACD である。
- 2) 胎生期マウス内耳に 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 を示す死細胞は約70%、約30%は NACD と発現率に変化を来す。
- 3) CDDP の内耳毒性によって胎生期マウスの内耳に死細胞が過度に出現し形成不全を来してしまうような状態を調節することが NACD の役割と予想され、ACD, NACD ともに“プログラム細胞死”と考えられた。
- 4) TUNEL 光顕観察で胎生期マウス内耳の ACD を示す死細胞はアポトーシスを来した type 1 死細胞と等しいと考えられたが NACD を示す死細胞には type 2, 3A, 3B 死細胞が含まれる可能性があった。また同観察で、ACD, NACD を示す死細胞に対する貪食処理様式は観察不可能であった。

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、またパラフィン連続切片作製に多大の技術

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。また統計学的解析について御指導いただいた情報科学教室 近藤芳朗教授に深謝致します。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）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）にて発表した。

文 献

- 1) Nagata S : Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355 - 365, 1997
- 2) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S : A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 : 43 - 50, 1998
- 3) Sakahira H, Enari M, Nagata S : Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S. *J Biol Chem* 274 : 15740 - 15744, 1999
- 4) Sakahira H, Takemura Y, Nagata S : Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD. *Arch Biochem Biophys* 388 : 91 - 99, 2001
- 5) Kawane K, Fukuyama H, Adachi M, Sakahira H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkin NA, Nagata S : Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. *Cell Death Differ* 6 : 745 - 752, 1999
- 6) Yokoyama H, Mukae N, Sakahira H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S : A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275 : 12978 - 12986, 2000
- 7) Uegaki K, Otomo T, Sakahira H, Shimizu M, Yumoto N, Kyogoku Y, Nagata S, Yamazaki T : Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J Mol Biol* 297 : 1121 - 1128, 2000
- 8) Otomo T, Sakahira H, Uegaki K, Nagata S, Yamazaki T : Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nat Struct Biol* 7 : 658 - 662, 2000
- 9) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 : 441 - 446, 1999
- 10) 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
- 11) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 : 555 - 556, 1980
- 12) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251 - 306, 1980
- 13) Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF : Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13 : 18 - 54, 1988
- 14) 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
- 15) Usami S, Takumi Y, Fujita S, Shinkawa H, Hosokawa M : Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res* 747 : 147 - 150, 1997
- 16) Nishizaki K, Anniko M, Orita Y, Karita K, Masuda Y, Yoshino T : Programmed Cell Death in the Developing Epithelium of the Mouse Inner Ear. *Acta Otolaryngol* 118 : 96 - 100, 1998

- 17) Bronckers AL, Goei W, Luo G, Karsenty G, D' Souza RN, Lyaru DM, Burger EH : DNA fragmentation during bone formation in neonatal rodents assessed by transferase-mediated end labeling. *J Bone Miner Res* 11 : 1281 – 1291, 1996
- 18) Hirano S, Norita M, Hoshino K, Meguro R : Morphological analysis of the early development of the chick neural tube separated from the floor plate and notochord. *Exp Neurol* 139 : 317 – 321, 1996
- 19) Nishizaki K, Anniko M, Orita Y, Masuda Y, Yoshino T, Kanda S, Sasaki J : Programmed cell death in the development of the mouse external auditory canal. *Anat Rec* 252 : 378 – 382, 1998
- 20) Hoke KL, Fernald RD : Cell death precedes rod neurogenesis in embryonic teleost retinal development. *Brain Res Dev Brain Res* 111 : 143 – 146, 1998
- 21) Nishizaki K, Anniko M, Orita Y, Masuda Y, Yoshino T : Programmed cell death in the mouse cochleovestibular ganglion during development. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 60 : 267 – 271, 1998
- 22) Scavo LM, Ertsey R, Chapin CJ, Allen L, Kitterman JA : Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18 : 21 – 31, 1998
- 23) Sanz C, Leon Y, Canon S, Alvarez L, Giraldez F, Varela-Nieto I : Pattern of expression of the jun family of transcription factors during the early development of the inner ear : implications in apoptosis. *J Cell Sci* 112 : 3967 – 3974, 1999
- 24) Hanke J : Apoptosis and occurrence of Bcl-2, Bak, Bax, Fas and FasL in the developing and adult rat endocrine pancreas. *Anat Embryol (Berl)* 202 : 303 – 312, 2000
- 25) Ju WK, Chung IW, Kim KY, Gwon JS, Lee MY, Oh SJ, Chun MH : Sodium nitroprusside selectively induces apoptotic cell death in the outer retina of the rat. *Neuroreport* 12 : 4075 – 4079, 2001
- 26) Ding J, Hu B, Tang LS, Yip HK : Study of the role of the low-affinity neurotrophin receptor p 75 in naturally occurring cell death during development of the rat retina. *Dev Neurosci* 23 : 390 – 398, 2001
- 27) Cole LK, Ross LS : Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240 : 123 – 142, 2001
- 28) Kurita H, Kawahara N, Asai A, Ueki K, Shin M, Kirino T : Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. *Neurol Res* 23 : 869 – 874, 2001
- 29) Avallone B, Balsamo G, Trapani S, Marmo F : Apoptosis during chick inner ear development : some observations by TEM and TUNEL techniques. *Eur J Histochem* 46 : 53 – 59, 2002
- 30) Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, Roth KA : Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis* 9 : 205 – 219, 2002
- 31) De Louw AJ, Van De Berg WD, De Vente J, Blanco CE, Gavilanes AW, Steinbusch HP, Steinbusch HW, Troost J, Vles JS : Developmental apoptosis in the spinal cord white matter in neonatal rats. *Glia* 37 : 89 – 91, 2002
- 32) Clarke PGH : Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181 : 195 – 213, 1990
- 33) Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Mori C, Nakamura N, Shiota K, Imamura M : Mechanism of apoptosis induced by cisplatin and VP-16 in PANC-1 cells. *Anticancer Res* 17 : 3445 – 3450, 1997
- 34) Siemer S, Ornskov D, Guerra B, Boldyreff B, Issinger OG : Determination of mRNA, and protein levels of p 53, MDM 2 and protein kinase CK 2 subunits in F 9 cells after treatment with the apoptosis-inducing drugs cisplatin and carboplatin. *Int J Biochem Cell Biol* 31 : 661 – 670, 1999
- 35) Jozan S, Paute S, Courtade-Saidi M, Julie S, Vidal S, Bugat R, Valette A : All trans retinoic acid enhances CDDP-induced apoptosis : modulation of the CDDP effect on cell cycle progression. *Int J Oncol* 20 : 1289 – 1295, 2002
- 36) Alam SA, Ikeda K, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Kikuchi T, Takasaka T : Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* 141 : 28 – 38, 2000
- 37) Kaufman MH : *The Atlas of Mouse Development*. 1 st ed, London, Academic Press. 1992, p 147
- 38) 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

- 39) 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
- 40) Decker RS : Retrograde responses of developing lateral motor column neurons. *J Comp Neurol* 180 : 635 – 660, 1978
- 41) Schweichel JU, Merker HJ : The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7 : 253 – 266, 1973
- 42) 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
- 43) Clarke PGH : Labelling of dying neurones by peroxidase injected intravascularly in chick embryos. *Neurosci Lett* 30 : 223 – 228, 1982
- 44) 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
- 45) Clarke PGH, Hornung JP : Changes in the nuclei of dying neurons as studied with thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 283 : 438 – 449, 1989
- 46) Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D, Vandebunder 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
- 47) Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS : Active cell death induced by the anti-estrogen tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture : the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17 : 1595 – 1607, 1996
- 48) Pilar G, Landmesser L : Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J Cell Biol* 68 : 339 – 356, 1976
- 49) 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
- 50) Sohal GS, Weidman TA : Ultrastructural sequence of embryonic cell death in normal and peripherally deprived tracheal nucleus. *Exp Neurol* 61 : 53 – 64, 1978
- 51) 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
- 52) Szumiel I : Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res* 150 : S92 – 101, 1998
- 53) Cardinaal RM, de Groot JC, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF : Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear Res* 144 : 135 – 146, 2000