

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated
dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)法による
パラフィン包埋切片上でのアポトーシス細胞の可視化：
蛋白分解酵素処理の検討を中心として

鳥取大学医学部病理学第一教室（主任 井藤久雄教授）

笠城典子・安達博信・石田雅人・尾崎充彦・井藤久雄

Visualization of apoptosis cells on paraffin-embedded sections by
terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin
nick end labeling (TUNEL) method: Analysis
on the effect of protease pretreatment.

Noriko KASAGI, Hironobu ADACHI, Masato ISHIDA,
Mitsuhiko OSAKI, Hisao ITO

*Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

Apoptosis is a specific mode of cell death recognized by a characteristic pattern of morphological and biochemical changes. DNA fragmentation is an important characteristic feature of apoptosis, while the detection of apoptosis in routine histological sections is difficult. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method detects DNA fragmentation by 3'-OH nickend labeling technique on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In this study, we examined the effects of enzyme treatments before TUNEL procedure using tissue sections of esophagus, stomach and small intestine. Pretreatment of the sections with DNase I resulted in intense TUNEL-signals in tissue sections of stomach and small intestine. Most suitable condition of the pretreatment was 20 µg/ml proteinase K digestion for 30 minutes in esophageal carcinomas. A few epithelial nuclei of upper and lower part of gastric mucosa and carcinoma cells showed strong TUNEL-signals with 20 µg/ml proteinase K digestion for 20 minutes. No signals and non-specific reaction were found in sections of small intestines, regardless of the digestion conditions. These results overall suggested that pretreatment of the tissue

sections with protease obviously enhances the TUNEL-signals, although the most suitable condition varies from specimen to specimen.

(Accepted on June 24, 1994)

Key words : TUNEL method, apoptosis, protease

緒 言

アポトーシスは細胞を除去するための生理的細胞死であり、壊死とは異なる。この現象は発生過程での形態形成や組織形成、自己反応性リンパ球の排除、正常組織における細胞交代や形態保持^{2), 3), 12), 13), 17), 18), 20), 21)}および腫瘍で見い出されている^{4), 7), 8), 11), 14)}。

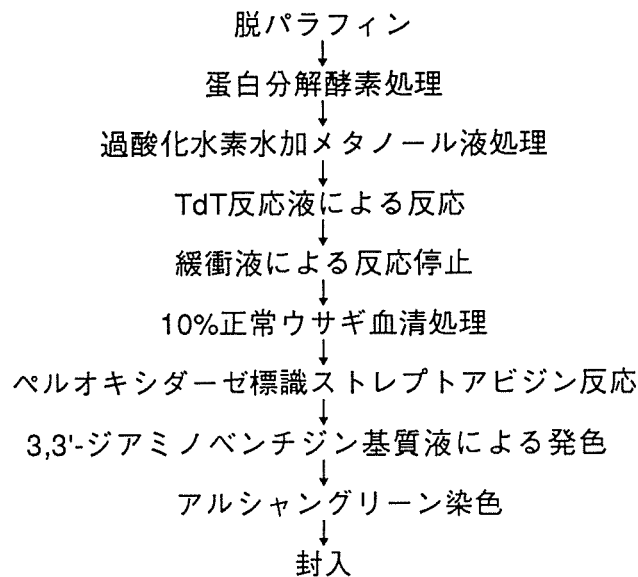
アポトーシスの生化学的特徴は、DNAのヌクレオソーム単位での切断であり、電気泳動像はラダー（はしご状）構造を示す²²⁾。形態学的には細胞容積の縮小、クロマチンの凝縮、核濃縮、アポトーシス小体への断片化が特徴的である^{12), 13), 22)}。最終的にはマクロファージや近接細胞により貪食除去されるか管腔内に排斥される。近年、Gavrieliら⁵⁾はホルマリン固定、パラフィン包埋標本切片でアポトーシスを同定するterminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling(以下TUNELと略す)法を報告した。本法はDNA 3'-OH基にビオチン標識dUTPをterminal deoxynucleotidyl transferase

(以下TdTと略す)によって結合させ、可視化する方法であり、DNAの切断が生じている細胞核に陽性シグナルが見いだされる。またTdT反応前に蛋白分解酵素処理による除蛋白を行うとTdT反応を高め、ヌクレオチドの結合が容易となる^{5), 19)}。しかし、これまでに報告されている蛋白分解酵素処理条件は、プロテイナーゼK(proteinase K; 以下PKと略す)で15分から30分、ペプシン(pepsin; 以下Pepと略す)では30分から60分^{1), 5), 7), 11), 19)}と様々である。そこで、TUNEL法における蛋白分解酵素処理の最適条件を決定するために、食道、胃、小腸を用いて、種々の条件でのTUNEL法の染色性について比較検討を行った。

材料と方法

本研究では外科的手術によって得られた食道2例(扁平上皮癌, 高分化型), 胃1例(乳頭腺癌), 小腸2例(線維性腹膜炎)を用いた。10%ホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックを3~4 μmに薄切し、シランコートスライドガラス(松浪硝

表1 TUNEL法の染色方法



子工業, 大阪) に貼付した. ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色標本で組織学的検索と細胞と核の形態観察をおこなった後, 以下の方法でTUNEL法を施行した.

1. TUNEL法による染色 (表1)

TUNEL法は, Gavrieliらの方法⁵⁾に準じて行った. 薄切標本は脱パラフィン後, 蛋白分解酵素による除蛋白を行い, 流水にて水洗した. 2%過酸化水素水加メタノール液で室温, 20分間反応して内因性ペルオキシダーゼをブロックしたのち水洗し, TdT緩衝液 (100mMカコシル酸カリウム, 2mM塩化コバルト, 0.2mMジチオトレイトール, pH 7.2) に3分間浸した. TdT緩衝液に0.3U/ μ l TdT (Gibco Brl. Life Technologies Inc., USA) と0.04nmol/ μ l ビオチン標識dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) を加えたTdT反応液で37°C, 90分間反応した. 次に, 緩衝液 (0.3M塩化ナトリウム, 30mMクエン酸ナトリウム) に15分間浸してTdT反応を停止した. リン酸緩衝食塩水 (以下PBSと略す) で洗浄し, 10%正常ウサギ血清 (生化学工業, 東京) で10分間反応後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (生化学工業) を30分反応させた. PBSで洗浄の後, 過酸化水素水を添加した3'3'-ジアミノベンチジン基質 (生化学工業) で発色, アルシヤングリーンで後染色を行った.

陰性コントロールは, 蛋白分解酵素未処理標本をTdT反応液の代わりに0.04nmolビオチン標識dUTP加TdT緩衝液で37°C, 90分反応した.

陽性コントロールとして, DNase I 処理を行った. 処理により, DNAが切断され細胞はアポトーシスの特徴的形態変化は示さないが, 細胞核がTUNEL陽性所見を示す.

胃と小腸で種々の条件のもとに蛋白分解酵素処理を行い過酸化水素水加メタノール液で反応後, 0.7 μ g/ml DNase I (Stratagen Co., USA) で室温, 10分処理した. その後, TdT反応液による反応を行い, TUNEL法の染色性について比較検討した.

2. 蛋白分解酵素による除蛋白の条件

蛋白分解酵素処理によるTUNEL法の染色性について比較検討するために表1の蛋白分解酵素処理を以下の条件で行った. 尚, 酵素はPKとPepの両者を用いた. また蛋白分解酵素の消化を高める目的で¹⁹⁾, パラフィン包埋標本でin situ

hybridizationする際に用いられる2×SSC, 80°C処理⁹⁾も施行した.

- (1) 蛋白分解酵素未処理.
- (2) 2×SSC (0.3M塩化ナトリウム, 30mMクエン酸ナトリウム, pH 7.0) で80°C, 10分の熱処理のみ.
- (3) 20 μ g/ml PK (pH 7.4) (Boehringer Mannheim) を室温, 10, 20, 30, 60分反応.
- (4) 2×SSCで80°C, 10分熱処理を行った後, 20 μ g/ml PKを室温, 10, 20, 30, 60分反応.
- (5) 0.5% Pep (pH 2.0) (Sigma, USA) で37°C, 10, 20, 30, 60分反応.
- (6) 2×SSCを80°C, 10分熱処理を行った後, 0.5% Pepで37°C, 10, 20, 30, 60分反応.

結 果

食道, 胃, 小腸における種々の蛋白分解酵素処理条件下でのTUNEL法による染色性の程度についての結果を以下に示す. 尚, 陰性コントロールではTUNEL陽性シグナルを見いださなかった.

1. 胃, 小腸におけるDNase I 処理標本のTUNEL染色性 (表2)

胃では蛋白分解酵素未処理 (図1A) を含めすべての処理条件で弱陽性から強陽性を示した. PK処理のみでは反応時間が長いと染色性は強くなるのに対し, 熱とPK処理を行った場合はPKの反応時間による染色性に違いはなかった. Pep30分処理では強陽性を示す (図1B) が, 60分反応すると染色性が弱くなり細胞質が黄色調に染色された. 熱とPep処理を行った場合, Pep10分反応では陽性を示すが, 20分以上になると染色性は弱くなり, 60分では切片が一部剝離した. 最も良好な結果が得られたのはPep30分処理であった.

小腸では蛋白分解酵素未処理では陰性であり, 熱処理のみ場合は切片が部分的に剝離した. PK処理のみは, 30分反応させた場合のみ陽性となった. 熱とPK処理の場合はPKの反応時間が長くなるにつれ染色性は強くなるが, 全ての反応時間で切片の部分的剝離が見られた. Pep処理のみは60分反応で陽性を示した. 熱とPep処理を行った場合, Pep60分反応で強陽性を示したが, すべての反応時間で広範囲な切片の剝離が生じた. 以上述べた如く染色性の強さは熱処理, Pep60分反応の場合が最も良好であったが, 広範囲な切片の

表2 DNase I 処理標本でのTUNEL染色性

組織	2 × SSC 80℃ (分)	酵素	酵素反応時間 (分)				
			0 (未処理)	10	20	30	60
胃	0	PK	+	++	++	++	+++
小腸			-	+	+	++	+
胃	10	PK	+	++	++	++	NT
小腸			-*	+*	+*	+++*	++++*
胃	0	Pep	+	+	++	+++	++
小腸			-	+	+	+	++
胃	10	Pep	+	++	+	+	+
小腸			-*	+*	+++*	+*	++++*

- : 陰性, + : 弱陽性, ++ : 陽性, +++ : 強陽性.

PK:proteinase K, Pep:pepsin.

NT:not tested.

* : 切片の剝離がみられたもの.

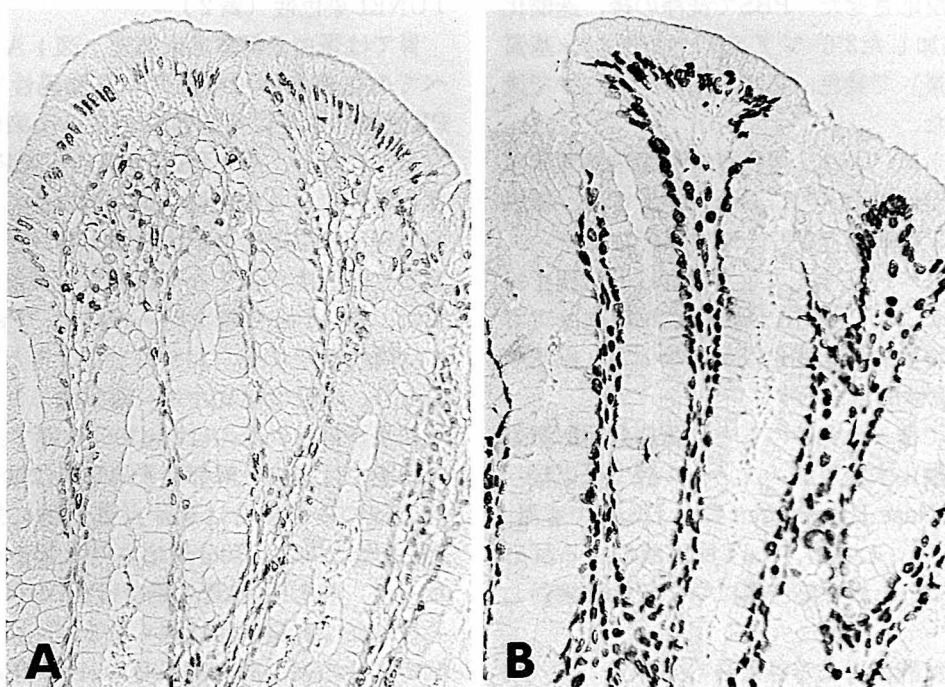


図1 DNase I 処理胃切片でのTUNEL染色

(A)蛋白分解酵素未処理. 非腫瘍部粘膜のすべての細胞核に微弱なTUNEL陽性シグナルがみられる.

(B)0.5% ペプシン, 30分処理. 非腫瘍部粘膜の細胞核が強陽性を示す.

A, B ×100

表3 食道におけるTUNEL染色性

症例 No.	2 × SSC 80℃ (分)	酵素	酵素反応時間 (分)				
			0 (未処理)	10	20	30	60
1	0	PK	—	+	—	—	—
2			—	+	++	+++	++
1	10	PK	—	+	+	++	—
2			+	++	+++	++	+
1	0	Pep	—	—	—	—	—
2			—	++	+	—	+
1	10	Pep	—	+	++	+	+
2			+	+	++	+	++

— : 陰性, + : 弱陽性, ++ : 陽性, +++ : 強陽性.

PK:proteinase K, Pep:pepsin.

* : 切片の剝離がみられたもの.

** : 細胞の崩壊がみられたもの.

剝離を生じた.

2. 食道, 胃, 小腸におけるTUNEL 染色性 (表3-5).

(1) 食道 (表3)

症例1, 2とも非腫瘍部では陽性所見を示さなかった. 腫瘍部において, 症例1では熱と蛋白分解酵素両者の処理を行った場合にのみ, 角化部や癌真珠の辺縁に陽性所見が得られた. しかし, 熱処理, PK60分反応では陰性となり, 熱処理, Pep60分反応では切片が一部剝離した. 症例2は蛋白分解酵素未処理では陰性であったが(図2 A, B), 熱処理を行っただけで癌胞巢の癌真珠辺縁にある核と少数の細胞核に弱陽性を示した. PK処理のみの場合は30分反応で強陽性であり, 後染色も良好であった(図2 C, D). 熱とPK処理の場合は20分間の反応で最も陽性が強く, PKの処理時間が長くなると染色性は弱くなり角化部が黄色調を示した. Pep処理のみの場合は反応10分で極く少数の癌細胞核と角化や癌真珠の部の核に陽性所見を示すのみであった. 熱とPep処理の場合では強陽性を示すものがなく, Pepを60分反応させると細胞の崩壊が見られた. 最も良好な結果が得られたのはPK30分処理であった.

(2) 胃 (表4)

蛋白分解酵素未処理の場合は非腫瘍部の少数の表層粘膜細胞と腺底部細胞の核および腫瘍部の腺腔を形成している少数の癌細胞核が陽性所見を示した. PK処理のみでは全ての条件下で陽性であったが, 20分間反応させた場合, 非腫瘍部(図3 A, B), 腫瘍部(図3 C)とも最も強く陽性となった. 熱とPK処理の場合, PKを20分以上反応させるとほとんどの平滑筋細胞や間質の細胞核に陽性所見を示し(図3 D), DNase I 処理の場合と同様な像であった. この様にDNase I 処理と同様な染色結果または陽性に染まった核が標本中に広範囲に見られる場合は非特異的な染色性を示すものと考えた. Pep処理のみ30分反応では強陽性を示したが, 背景が黄色調となり, 後染色も不良であった. 熱とPep処理の場合, Pepで20分間反応させたときのみ陽性を示した. PK20分処理で最も良好な結果を得た.

(3) 小腸 (表5)

症例1は熱処理, Pep60分反応以外は陰性であった(図4 A). 熱処理, Pep60分の反応の場合, 大部分の細胞核が陽性となる非特異的な所見と細胞の崩壊を示した. 症例2は蛋白分解酵素未

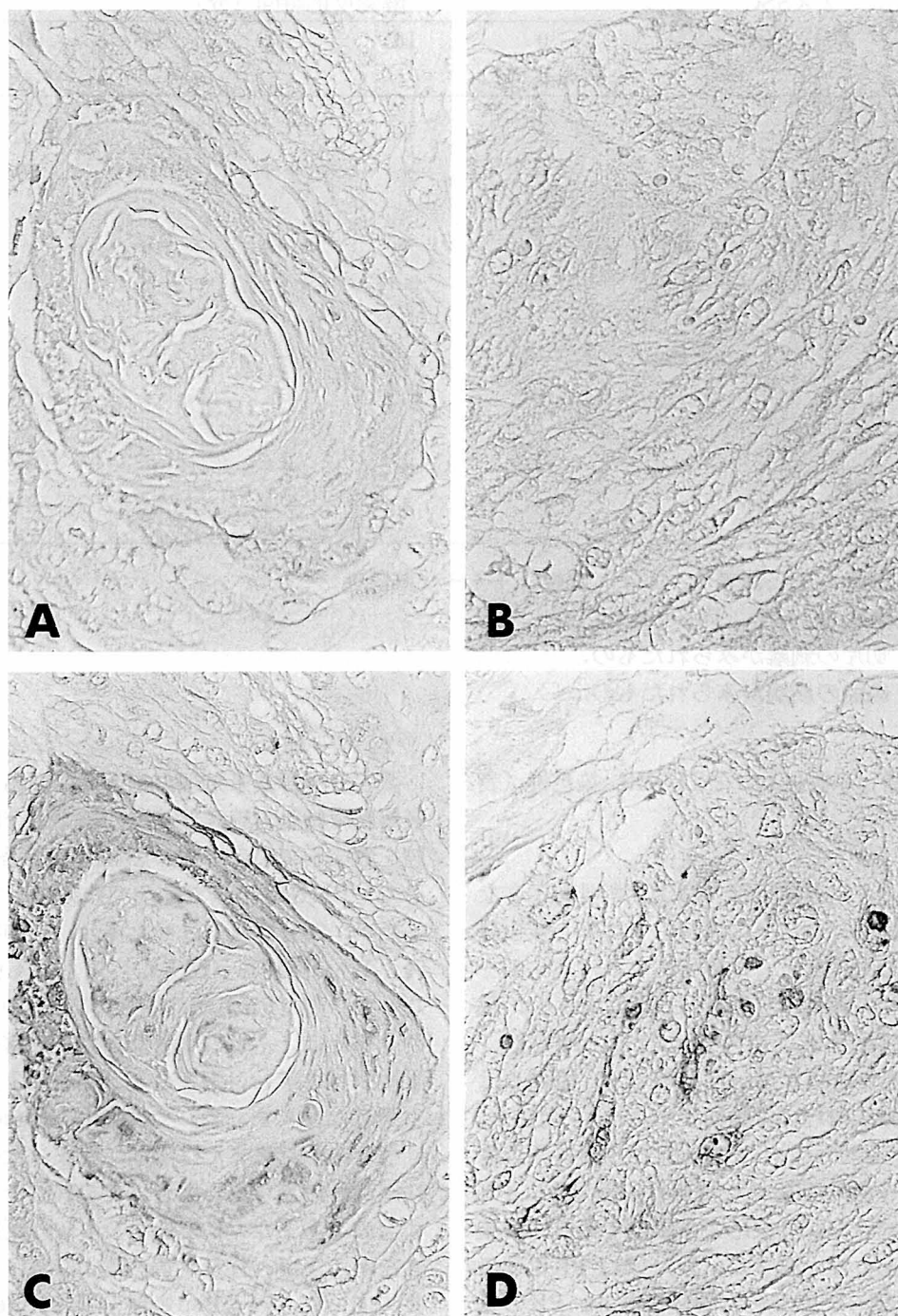


図2 食道（症例2）におけるTUNEL染色

蛋白分解酵素未処理：癌胞巣の癌真珠部（A）と癌細胞核（B）に陽性シグナルはない。

20µg/mlプロテイナーゼK，30分処理：癌真珠辺縁に見られる核（C）と癌胞巣における少数の細胞核（D）に見いだされたTUNEL陽性シグナル。

A-D ×100

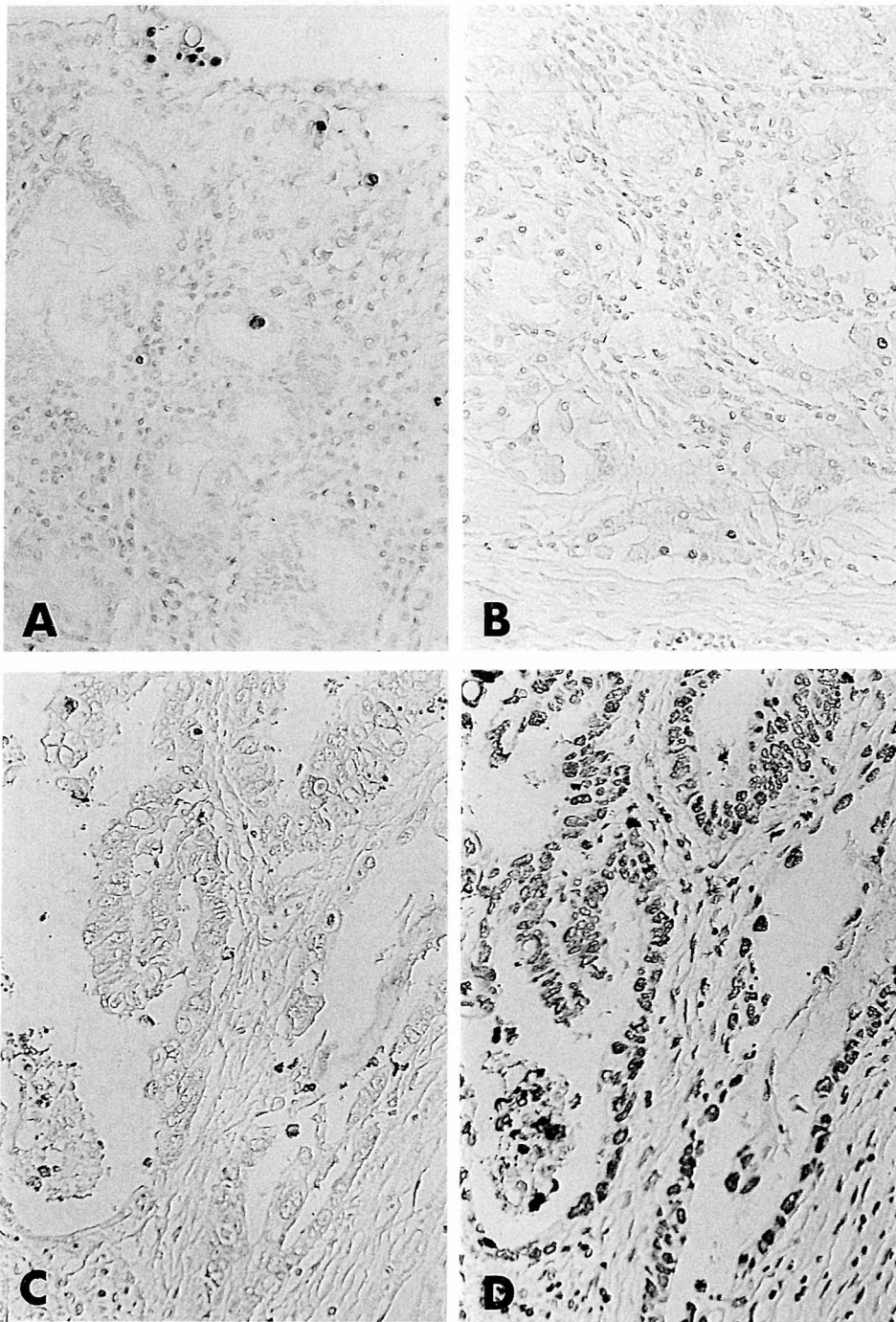


図3 胃切片でのTUNEL染色

20 μ g/mlプロテイナーゼK, 20分処理: 非腫瘍部で少数の表層粘膜細胞核 (A)と腺底部の上皮細胞核 (B)において陽性シグナルが散見される. 胃癌では少数の腫瘍細胞核 (C)が強陽性を示す.

2 \times SSC, 10分反応後20 μ g/mlプロテイナーゼK, 60分処理では, 大部分の細胞核が陽性であり非特異的所見と見なされる (D:Cの連続切片).

A-D \times 100

表4 胃でのTUNEL染色性

2 × SSC 80℃ (分)	酵素	酵素反応時間 (分)				
		0 (未処理)	10	20	30	60
0	PK	+	++	+++	++	++
10	PK	+	+	NS	NS	NS
0	Pep	+	++	+	+++	+
10	Pep	+	+	++	+	+

—:陰性, +:弱陽性, ++:陽性, +++:強陽性.

PK:proteinase K, Pep:pepsin.

NS:non-specific staining.

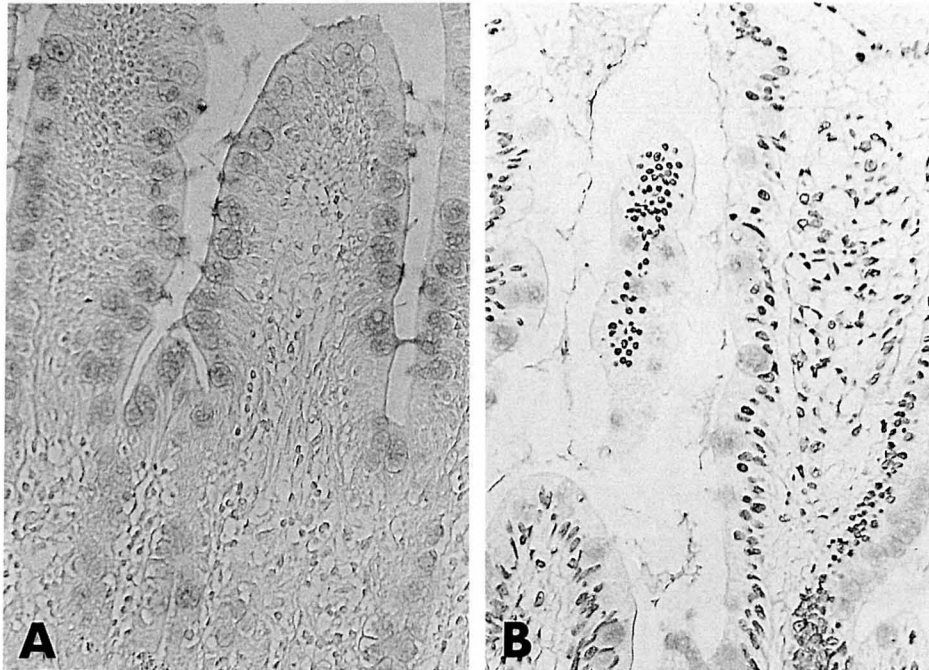


図4 小腸でのTUNEL染色

(A)症例1. 20 μ g/mlプロテイナーゼK, 20分処理. 絨毛の上皮細胞はTUNEL シグナル陰性.

(B)症例2. 20 μ g/mlプロテイナーゼK, 20分処理. 絨毛のほとんどの細胞がTUNEL シグナル陽性で, 非特異的所見と見なされる.

A-B \times 100

表5 小腸でのTUNEL染色性

症例 No.	2 × SSC 80℃ (分)	酵素	酵素反応時間 (分)				
			0 (未処理)	10	20	30	60
1	0	PK	—	—	—	—	—
2			—	NS	NS	NS	NS
1	10	PK	—	—	—	—	—
2			—	NS	NS	NS	NS
1	10	Pep	—	—	—	—	NS**
2			—	NS	NS	NS	NS

—:陰性, +:弱陽性, ++:陽性, +++:強陽性.

PK:proteinase K, Pep:pepsin.

NS:non-specific staining.

** : 細胞の崩壊がみられたもの.

処理以外の全ての条件で, 大部分の平滑筋細胞や間質の細胞核に陽性を示す非特異的な所見を示した(図4B). 以上の如く, 小腸では蛋白分解酵素処理の適切な条件を見いだせなかった.

考 察

TUNEL法はアポトーシスの特徴のひとつであるDNAの断片化^{12), 15), 16), 22)}を組織切片上で特異的に同定する方法である⁵⁾. 本法を用いると組織標本で断片化を起こした細胞核を確認できるが, 切断が起こった全てのDNAを同定するため, 壊死に陥った細胞にも弱く, 瀰漫性に染色される^{1), 11), 19)}.

本研究において, 食道では角化部や癌真珠の辺縁に見られる核と少数の扁平上皮癌細胞核に, 胃では表層粘膜細胞核と腺底部の細胞核, そして腺腔を形成する癌細胞核に少数の陽性所見を得た. これらの結果はHiraishiら⁷⁾, Kasagiら¹¹⁾の結果と同様である. 陽性所見はアポトーシスの形態的特徴を示す細胞のみでなく, アポトーシスの変化を示していない細胞核にも見られた. このことは形態的变化が起こる以前に核内DNAの断片化が始まっていることを示唆しており, Gorczycaら⁶⁾が述べているようにアポトーシス初期において, 核辺縁部にDNA断片化が生じているためと考えられる.

TUNEL法はアポトーシスの組織学的検討に有用な方法であるが, 酵素の最適な処理条件についての報告は少なく, 条件も様々である^{1), 5), 7), 11), 19)}. 今回行った種々の条件下での蛋白分解酵素処理の結果では, 蛋白分解酵素未処理の場合はTUNEL染色陰性を示す場合が多いが, 蛋白分解酵素処理を加えることにより陽性所見を得ることができた. これは蛋白分解酵素処理により核内蛋白を除去し, TdT反応におけるDNA 3'-OH末端でのピオチン標識dUTPとの結合を高めるため生じたものである^{5), 19)}. このことはTUNEL法を行う場合, 蛋白分解酵素による前処理が必要であることを示している. しかし, 過度の蛋白分解酵素処理により, 非特異的な陽性像を示したり, 染色性低下を示す場合があった. 前者は過度の蛋白分解酵素処理によりDNAに損傷を与えた結果であり, 後者は蛋白の分解が進み, 染色性が低下したと考えられる.

蛋白分解酵素の前に熱処理を行うと核酸と蛋白の結合をゆるめ蛋白分解酵素の消化を高めると報告されている¹⁹⁾. 本研究でも熱処理を行うことにより反応時間が短縮され, 熱処理が反応を高めることを示唆している. しかし, 切片の剝離が生じることがあり, 十分な注意が必要である.

食道と小腸では症例によって染色結果が異なった. これは標本採取からパラフィン標本作製まで

の過程における相違が関係していると考えられる。特に非特異的染色は、標本採取から切片作製までの間に生じたDNAの損傷に起因するのかもしれない。材料の固定に関してはラット及びヒト手術切除標本では、8% PFAで18時間固定が最適であるという報告があり¹⁰⁾、固定液の種類、濃度、固定時間の相違が染色結果に影響することも考えられる。今回、食道と胃における蛋白分解酵素処理条件で最も良いと思われる反応時間は全て異なり、組織によって最適な蛋白分解酵素処理条件が異なっていることを示唆している。

DNase I で核内DNAを切断した標本は蛋白分解酵素処理が長く、更に熱処理を加えた方が陽性像は強かった。これは除蛋白を行うことでDNase I による切断を高め、さらに、TdTの反応を促進するためと思われる。尚、蛋白分解酵素処理の最適時間は、DNase I 未処理の場合とは異なっていた。TUNEL染色を行う際にDNase I 処理標本を用いて酵素処理条件を決定すべきでないことを示唆している。

小腸のアポトーシスに関して、Gavrieliら⁵⁾は絨毛先端に、Ansariら¹⁾はラット小腸のクリプトにアポトーシス細胞が見られたと報告しているが、本研究では陽性像を得ることができなかった。Gavrieliら⁵⁾やAnsariら¹⁾とは本研究の染色条件と異なる点があるので、組織固定条件やTdT反応時間についても検討が必要と思われる。

蛋白分解酵素処理条件の比較検討の結果から、蛋白分解酵素処理により染色性が増強され、酵素処理が必要であることが明らかとなった。PK, Pepとも20分から30分処理で良い結果が得られる傾向にはあるが、組織および標本が異なると反応時間が変動する可能性があり、蛋白分解酵素処理の適切な条件をその都度決定する必要がある。

本研究の一部は文部省科学研究費（課題番号02670137）の援助を受けた。

文 献

1) Ansari, B., Coates, P. J., Greenstein, B. D. and Hall, P. A. (1993) In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170, 1-8.
2) Bursch, W., Kleine, L. and Tenniswood,

M. (1990). The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem cell Biol* 68, 1071-1074.
3) Bursch, W., Paffe, S., Putz, B., Barthel, G. and Schulte-Hermann, R. (1990). Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11, 847-853.
4) Fukasawa, Y., Ishikura, H., Takada, A., Yokoyama, S., Imamura, M., Yoshiki, T. and Sato, H. (1994). Massive apoptosis in infantile myofibromatosis. A putative mechanism of tumor regression. *Am J Pathol* 144, 480-485.
5) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
6) Gorczyca, W., Gong, J. and Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53, 1945-1951.
7) Hiraishi, K., Suzuki, K., Hakomori, S. and Adachi, M. (1993). Le^Y antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 3, 381-390.
8) Hollowood, K. and Macartney, J. C. (1991). Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. *J Pathol* 163, 337-342.
9) Hopman, A. H. N., van Hooren, E., van de Kaa, C. A., Vooijis, P. G. P. and Ramaekers, F. C. S. (1991). Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 4, 503-513.
10) 今谷 晃, 笹野公伸, 浅木 茂, 名倉 宏 (1994). ヒト胃粘膜におけるcell turnoverの検討—Apoptosisの関与を中心に. 日本病

- 理学会会誌 83, 178.
- 11) Kasagi, N., Gomyo, Y., Shirai, H., Tsujitani, S. and Ito, H. (1994). Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). *Jpn J Cancer Res* 85, (印刷中)
 - 12) Kerr, J. F. R., Searle, J., Harmon, B. V. and Bishop, C. J. (1987). Apoptosis. *Perspectives on Mammalian Cell Death* (ed. C. S. Potten). pp. 93-128. Oxford University Press. Oxford.
 - 13) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
 - 14) Sarraf, C. E. and Bowen, I. D. (1988). Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. *Cell Tissue Kinet* 21, 45-49.
 - 15) Shi, Y., Szalay, M. G., Paskar, L., Boyer, M., Singh, B. and Green, D. R. (1990). Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. *J Immunol* 144, 3326-3333.
 - 16) Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F. and Anderson, P. (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639.
 - 17) Ucker, D. S. (1991). Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *The New Biologist* 3, 103-109.
 - 18) Umansky, S. R. (1982). The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol* 97, 591-602.
 - 19) Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., van de Velde, C. J. H., Cornelisse, C. J. and van Dierendonck, J. H. (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochemi Cytochemi* 41, 7-12.
 - 20) Williams, G. T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-1098.
 - 21) Wyllie, A. H. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *Cell Death in Biology and Pathology* (ed. I. D. Bowen and R. A. Lockshin). pp. 9-34. Chapman and Hall, London.
 - 22) Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.