

# 螢光色素 dis-C<sub>3</sub>-(5)による Ehrlich 腹水癌細胞の 膜電位測定ならびにその内在呼吸阻害機構の 解析と癌治療への応用

岡山大学医学部産婦人科教室 (主任: 関場 杏教授)

秋 山 実 男

(昭和54年11月9日受稿)

**Key words:** dis-C<sub>3</sub>-(5), endogenous respiration, membrane potential,  
Ehrlich ascites tumor cell, mitochondria,

## 緒 言

癌細胞は、その個体の代謝調節に影響されることなしに無限に増殖する。この直接的な主要な原因として、代謝調節に応答する機構に変化または欠損があるためと答えられるが、同時に細胞内での代謝調節機構の特異性に依存する所も大きいと考えられる<sup>1)2)</sup>。この代謝特性については、古くからクラビトリ効果として知られてきたが<sup>3),4)</sup>、モーリスの最小偏奇癌の発見<sup>5),6)</sup>以来忘れ去られているのが現状である。しかしながら、癌細胞の悪性度の高いものではクラビトリ効果の活性が著しく高く、この性質に関する研究は現在の細胞表面受容体に関する研究と共に、癌細胞の特性究明のためには忘れてならないものといえる。

これと関連して、たとえば最近の S.J.Singer ら<sup>7)</sup>の研究によれば、温度感受性変異株のラウス・ザルコーマ・ウイルス (Rous Sarcoma Virus LA 23) により感染したラット腎細胞は33°Cで形質転換し、細胞骨格系や細胞形態をはじめ、DNP やオリゴマイシン感受性の嫌氣的解糖に特性が示され、39°Cでは正常な細胞形態と代謝を営む。しかも、33°Cにおいても蛋白合成阻害剤存在下には、この形質転換の性質が全く示されないといわれている。これらのことは Rous Sarcoma Virus の src gene が、pleiotypic enzyme modification 反応で2つ以上の形質の発現に関与している可能性を示唆している。すなわち、形質転換の遺伝子による合成蛋白が細胞表面や細胞

骨格系と同時にエネルギー代謝系での修飾を誘導し、癌細胞としての特性を形づくっていると考えられる。このような研究から考えれば、癌細胞での高い内在呼吸自体も形質転換にとってかなり重大な変化であると考えられる。

以上のような知見に立脚して、癌細胞内在呼吸の解析を行ない、それがすでに明らかにされているように細胞内アデニンヌクレオチドによって活性度が調節されていること<sup>4)</sup>を再確認し、その糖代謝に共役して著しい細胞膜電位変化が示されることを明らかにした。また、その時細胞膜電位測定のために使用されているシアニン系色素により、その微量で著しく阻害されることも明らかにした。本研究では、特に Ehrlich 腹水癌細胞を使用し、糖代謝に伴う膜電位変化の機構及びこの測定試薬による内在呼吸の強い阻害機構について解析を行ない、さらに、シアニン系色素による Ehrlich 担癌マウス腹水中における in vivo でこの試薬の作用並びに延命効果についても検討し、得られた結果について報告する。

## 実験材料および方法

供試材料には、主として Ehrlich 腹水癌細胞 (以下 EATC と略す) の移植後7~9日目の細胞を使用した。必要に応じて Rous Sarcoma 細胞、モルモット多核白血球、ラット脾臓細胞、Dodge ら<sup>8)</sup>の方法によって調整された人赤血球細胞のゴースト、Hogebloom ら<sup>9)</sup>の方法によって分離されたラット肝ミトコンドリアを使用した。

## 方法:

細胞及びミトコンドリアの酸素消費は、クラーク型酸素電極 (Yellow Spring Instrument Co.) により溶存酸素の減少から測定した。細胞膜電位変化の測定は Hoffman ら<sup>10)</sup>の法方に従った。すなわち、シアニン系色素の一種、3,3'-dipropyl-2,2'-thiodicarbocyanine iodide ( $0.3\mu\text{M}$ )、を細胞懸濁液 ( $5.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ ) に添加し、島津製作蛍光分光光度計 (RF-510) 型により  $622\text{nm}$  で励起し、 $670\text{nm}$  の蛍光強度変化の測定より求めた<sup>11)</sup>。また、膜 ATPase 活性は高橋の方法<sup>12)</sup>により遊離する無機リン酸量から測定した。細胞内  $\text{K}^+$  の遊出は反応液中の  $\text{K}^+$  の変化量を陽イオン電極 (Beckman P/N39137) により測定した。細胞内の DNA 合成は  $^3\text{H}$ -チシジンの酸不溶性分画への取り込みより測定した。細胞内アデニンヌクレオチド量は、Pressman ら<sup>13)</sup>の方法により、Dowex-1 カラムクロマトグラフィーにより定量した。また、細胞膜組み込み蛋白の側方移動は FITC-Con A による Cap 形成を蛍光顕微鏡で観察した。なお、細胞懸濁液への試薬の添加は反応液量の  $1/100$  以下の容積で行なった。バリノマイシン、オリゴマイシンは、Calbiochem. のものを使用し、シアニン色素は日本感光色素研究所の恵与によった。その他に使用した薬物はすべて特級試薬で、溶液は再蒸留水またはアルコールで溶解して使用した。

## 結 果

## 1. Ehrlich 腹水癌細胞内在呼吸におよぼす種々薬物の作用

腹水癌細胞は、その旺盛な増殖と共に、それらに平行した高い内在呼吸を示すことは、よく知られた事実である。そして、この高い内在呼吸は旺盛な増殖に要求される種々の代謝のためのエネルギー源を得るためかもしれない。しかも、それらの活性は細胞内 ADP 量と  $\text{P}_i$  量に依存し<sup>14)15)</sup>、ADP と  $\text{P}_i$  の増加する条件下では、ATP 合成のためのミトコンドリアにみられる呼吸開放のためと考えられる。したがって、ATP 分解反応すなわち広義の ATPase によって生ずる ADP と  $\text{P}_i$  に依存して呼吸が調節されていると考えることができる。

これに関しては、W.D. Currie and C.T. Gregg<sup>16)</sup> が報告しているごとくオリゴマイシン感受性内在呼吸が85%で、それが細胞内 ATP 合成活性に依存していることは確かである。すなわち、図-1. に示すごとくミトコンドリアの酸化的リン酸化反応にお

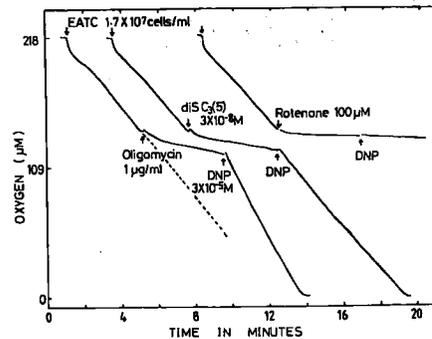


図-1. エールリッヒ腹水癌細胞の内在呼吸におよぼす酸化的リン酸化反応阻害剤の影響  
エールリッヒ腹水癌細胞 (EATC),  $1.7 \times 10^7 \text{ cells/ml}$  を、 $1\text{mM CaCl}_2$ ,  $1\text{mM MgCl}_2$  含有 Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (KRP) ( $\text{pH} 7.4$ ) 中に懸濁し、クラーク酸素電極を用い  $37^\circ\text{C}$  で測定した。また、添加試薬はアルコールまたは水に溶解させ、反応液 ( $3 \text{ ml}$ ) の  $1/100$  量以下の量を用いた。

けるエネルギー転移反応阻害剤であるオリゴマイシンにより、無傷の EATC の内在呼吸は90%近く阻害され、続く脱共剤の DNP ( $2, 4\text{-dinitrophenol}$ ) 添加によって、オリゴマイシン阻害呼吸は再び開放される。このことは、EATC の内在呼吸のほとんどが、ATP 合成に依存した呼吸であることを示している。同様なことは先の研究者らの研究において、内在呼吸は細胞の無傷性の高い場合にオリゴマイシン阻害度が100%に近づくといった、ワールブルグ検圧法による報告と一致している。なお、オリゴマイシンによる呼吸阻害はその濃度と阻害割合との関係において、細胞レベルにおいては直線の相関性を示すが、ミトコンドリアのそれはシグモイド曲線になると考えられている。しかし、本研究においてその相関性は、細胞レベルもミトコンドリアレベルも、ほぼ近似したシグモイド曲線が得られた (図-2)。この点に関してはなお研究、解析の余地があるものと思われる。これらの実験結果は EATC の高い内在呼吸が ADP のリン酸化のために使用されていることを証明するが、それでは実際に細胞内の広義の ATPase、すなわち ATP 利用系反応のいずれが主体をなしているかを調べる必要がある。考えられる ATP 利用系反応は極めて多いが、その主要な反応には、細胞内代謝を営むための物質輸送と、細胞内物質の合成分解等の代謝があげられる。

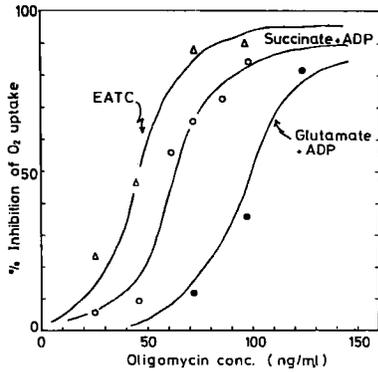


図-2. EATCの内在呼吸とラット肝分離ミトコンドリアのリン酸化呼吸におよぼすオリゴマイシンの効果

EATCの内在呼吸測定実験条件は、図-1と同じ。ラット肝分離ミトコンドリア (RLMt) 1.2mg protein/mlを、0.15M Sucrose, 20mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaPi (pH7.4) 液中に懸濁し、クラーク型酸素電極を用いて25°Cで測定した。

表-1に、これらの種々の阻害剤による、EATC

の内在呼吸阻害の阻害割合を示した。この表から明らかごとく、KCNやアンチマイシンで電子伝達系が阻害されることはもちろんであるが、強いロテノン感受性呼吸を示し、また前述のようにオリゴマイシンやDNPによって著しく変化する。それ以外の薬物については、特に能動輸送系によるATPaseが最も大きく呼吸に影響を与えるが、RNA, DNA 蛋白合成等によるATP利用の阻害によってはほとんど呼吸に変化は認められない。もちろん諸言で述べたごとく、グルコースによるクラビトリー効果といえる呼吸阻害は著しく、その阻害度は約50%と高い。

以上の結果は、EATCの内在呼吸に依存したATP合成の利用系の主要な代謝が、細胞内への物質輸送といってもよいことを示す。もちろんここで測定した内在呼吸阻害は阻害剤添加後わずか10分以内の変化であり、さらに長時間的作用によっては各々の代謝におけるATP利用を反映した結果が予期されることはいうまでもない。なお、グルコースによるクラビトリー効果については次の項で検討する。

2. EATCのグルコースによるクラビトリー効果と細胞加齢に伴う変化及び膜安定試薬による回復効果について

表-1. EATCの内在呼吸におよぼす様々な薬剤の効果

EATC (1×10<sup>7</sup> cells/ml) を図-1と同じ実験条件で測定した

consumed per cent oxygen of control natoms/ml

No addition	86.8	100
ATPase inhibitors	67.2	77.4
Ouabain (2×10 <sup>-4</sup> M)	61.6	71.0
Quercetin (1×10 <sup>-4</sup> M)	16.8	19.4
Oligomycin (1 μg/ml)	91.0	106.0
Ruthenium red (10 μM)	91.0	106.0
Inhibitors of energy and electron transfer reaction	6.0	8.0
KCN (1×10 <sup>-3</sup> M)	6.0	8.0
Antimycin A (1 μg/ml)	6.0	177.0
DNP (3×10 <sup>-5</sup> )	154.0	100.0
Valinomycin (3×10 <sup>-7</sup> M)	86.0	100.0
Tetraphenyl boron (8×10 <sup>-5</sup> M)	86.0	100.0
NaF (1×10 <sup>-2</sup> M)	86.0	100.0
Metabolic inhibitors		
5FU (170 μg/ml)	86.0	100.0
Actinomycin D (2 μg/ml)	86.0	100.0
Cycloheximide (2 μg/ml)	86.0	100.0
Chloramphenicol (2 μg/ml)	86.0	100.0
Glucose (2×10 <sup>-2</sup> M)	42.0	48.4
Membrane bound substances		
dis-C <sub>3</sub> (5) (150nM)	14.0	16.1
Safranin (3×10 <sup>-5</sup> M)	86.0	100.0
NK1507 (1 μg/ml)	86.0	100.0

緒言にも述べたごとく細胞の形質転換に伴う細胞エネルギー代謝の変化は、それとは全く独自に膜機能や細胞骨格系に変化が起きることが明らかにされている<sup>17)</sup>。そのような事実をふまえ、ここではこの両者すなわち細胞膜機能の変化が細胞内エネルギー代謝調節にかなり密接に関連していることを示唆する現象について述べる。

すなわち、EATCは図-3に示すごとくその懸濁

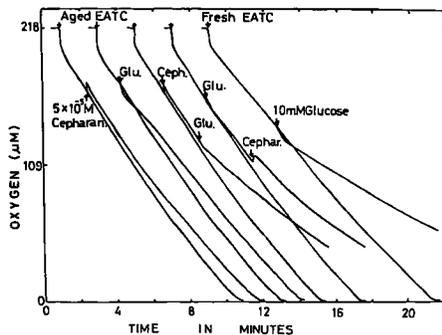


図-3. EATCのクラビトリ-効果におよぼす cepharanthine の効果と EATC の加齢との関係 EATC を  $(1.9 \times 10^7 \text{ cells/ml})$  図-1 と同じ実験条件で測定した。

液にグルコースを添加すると、一過性の呼吸促進が示され、続いて強い内在呼吸の阻害が示される。この呼吸阻害度は細胞の加齢 (37°C 中の反応液にて) に伴い次第に消失する。しかし、細胞膜安定化作用がある Cepharanthine の微量添加によりその加齢効果は消失し、その後のグルコース添加により強いクラビトリ-効果が認められるようになる。また、このクラビトリ-効果は、反応液中に KCl を含む場合 (KRP) はバリノマイシンや TPB (tetra-phenyl borone) によってその呼吸阻害が開放されるが、Mannitol 液中ではそれらによって殆んど影響をうけない。(図-4)

これら2つの実験結果は、グルコース添加による EATC で示されるクラビトリ-効果が、細胞膜の機能変化によって、膜透過性イオンを介してかなり著しく影響されることを示す。

### 3. グルコース代謝による細胞膜電位変化のシアニン色素による測定

EATC の細胞代謝が細胞膜により調節されることはいままでもないが、その中でも特に膜の物性が重要な因子と考えられる。例えば膜流動性や透過性、

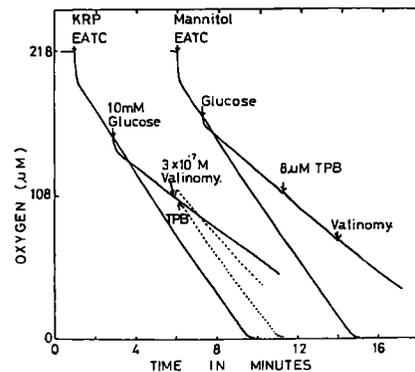


図-4. EATC のクラビトリ-効果の反応液による違い EATC ( $2.1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ) を KRP あるいは  $0.15 \text{ M}$  の Mannitol 中に懸濁し、測定した。

更には膜電位等の変化の代謝調節への影響は重要である。この様な理由から、膜電位変化に依存して細胞内に取り込まれる脂溶性イオンを用いる膜電位測定<sup>18)19)</sup>を試みた。シアニン系の一種 3,3'-dipropyl-2,2'-thidicarboyanine iodide (以下 dis-C<sub>3</sub>(5) と略す) は Hoffman ら<sup>20)</sup>により開発された開膜電位試薬で、現在最も盛んに使用されているプローブである。このシアニン色素を用い EATC の内在呼吸や解糖による膜電位変化について測定した結果は図-5 のよう

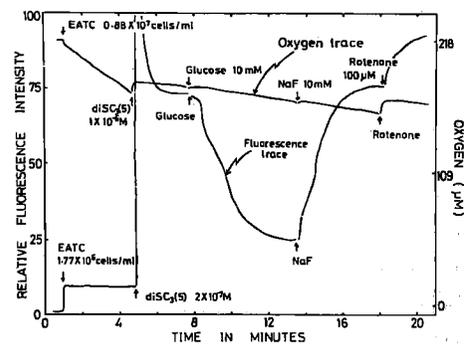


図-5. EATC 膜電位測定の際の内在呼吸変化と膜電位変化について 内在呼吸変化は EATC ( $0.88 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ) を、図-1 と同じ条件で測定した。膜電位変化は、dis-C<sub>3</sub>(5) ( $0.2 \mu\text{M}$ ) を EATC ( $1.77 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ ) 懸濁液に添加し、622nm で励起し、670nm の蛍光変化を測定した。

ある。すなわち内在呼吸に依存した一定の膜電位が示され、ロテノンによるその阻害によって電位は低下する。このような細胞にグルコースを添加すれば再び膜電位は増大し、その電位差変化は解糖阻害剤によって消失する。

ここで図-5のグルコース添加に伴う螢光変化を詳細に解析すると、それは2つの合成波と考えることができる。すなわちその1つはグルコース取り込みのために膜電位が低下するもので、他の1つはグルコース代謝に伴うエネルギー供給による電位の増大である。

4. 細胞膜電位測定試薬 (シアニン系色素 dis-C<sub>3</sub>(5))  
 による EATC の内在呼吸阻害

さて、この膜電位測定において dis-C<sub>3</sub>(5)は細胞膜と結合するのみならず細胞内に取り込まれ、EATCの内在呼吸を著しく阻害することが呼吸と膜電位の同時測定から明らかにされた。図-6はその阻害の

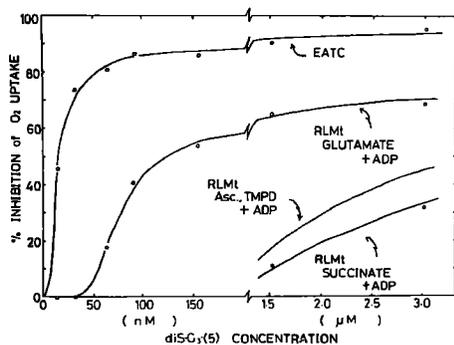


図-6. EATCの内在呼吸ならびに RLMt のリン酸化呼吸におよぼす呼吸阻害度  
 図-1, 図-2と同じ実験条件により求めたものである。

濃度依存性を示すものであるが、 $2 \times 10^{-8} M / 10^7$  cells の低濃度で1/2阻害を示す。しかし、この濃度においてはミトコンドリアのNAD連鎖呼吸やコハク酸呼吸に対してほとんど作用は認められず細胞膜を介して何らかの作用によって内在呼吸の阻害をきたすことが推察される。

しかも、非常に興味あることは、この dis-C<sub>3</sub>(5)で阻害された内在呼吸は DNP やバリノマイシン、さらには TPB で開放される(図-7)。この現象は、先に示した EATC のオリゴマイシンによる呼吸阻害と DNP バリノマイシン、TPB による開放といった

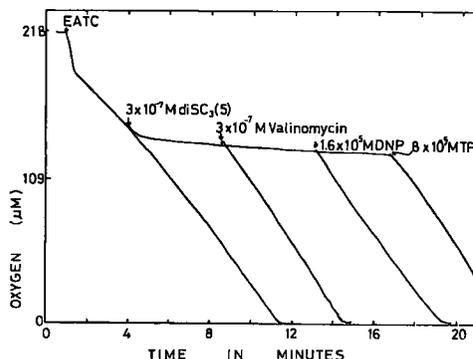


図-7. EATCの内在呼吸におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の呼吸阻害効果と種々の薬物による阻害呼吸の開放  
 実験条件は図-1と同じ。

現象と極めて類似しており、dis-C<sub>3</sub>(5)がオリゴマイシン様のリン酸化呼吸阻害作用を有することを示唆している。

また、このような dis-C<sub>3</sub>(5)による内在呼吸阻害は *Rous ascites Sarcoma* 細胞、山羊精子細胞等にも観察され、さらにラット脾臓細胞の内在呼吸に対しても加齢した条件下では阻害作用が認められる。これに反して Con A による多核白血球の HMP shunt の上昇や、それに伴う O<sub>2</sub> 形成等に対しては阻害が認められない。

しかし、EATCのDNPで開放された脱共役呼吸や内在呼吸のいずれに対しても同一百分率で阻害が示され、これが単なるミトコンドリアの電子伝達系の阻害作用に起因する可能性も示唆される(図-8)。

5. dis-C<sub>3</sub>(5)による EATC の ATP 依存性反応の阻害

dis-C<sub>3</sub>(5)が細胞の ATP 依存性の種々の反応に対して阻害的に作用し、内在呼吸に依存した酸化的リン酸化反応の結果生成される ATP 量に、影響を与えることを示唆するいくつかの実験結果が得られた。

すなわち、その1つは、図-9に示すごとく Simonsら<sup>21)</sup>の Ca<sup>2+</sup>dependent K<sup>+</sup>transport を阻害する。また FITC-Con A による膜結合蛋白の ATP に依存した側方移動の結果形成される Cap 形成も、内在呼吸阻害の濃度依存性と全く一致して阻害する(図-10)。また、EATC (1 X 10<sup>6</sup> cells/ml) を、Eagle MEM に10% FCS を加えた培養液で37℃にて培養した結果、<sup>3</sup>H-TdR(1μCi/ml)の酸不溶性分画への取り込

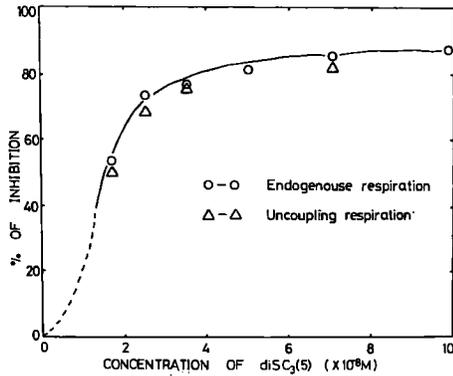


図-8. EATCの内在呼吸と、脱共役呼吸におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の阻害効果  
実験条件は図-1と同じ。

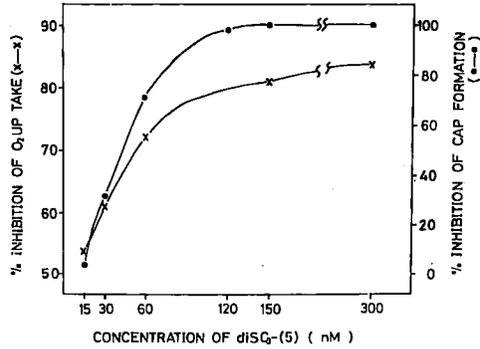


図-10. EATCの内在呼吸ならびに FITC-Con A による Cap 形成におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の阻害度との関係  
Cap 形成は EATC (5 X 10<sup>5</sup> cells/ml) の KRP 0.9ml に FITC-Con A (100 μg/ml) の 0.1ml を加え、37°C に 10 分間保温して行った。dis-C<sub>3</sub>(5) は Con A を加える 5 分前に細胞懸濁液に添加した。この反応後、グルタルアルデヒドを加え、固定し、蛍光顕微鏡 (NIKON-FL) 下にて観察した。細胞の一方の端にのみ蛍光が認められ細胞数を 100 個の細胞について 3 回算定し、その平均値より阻害率を求めた。

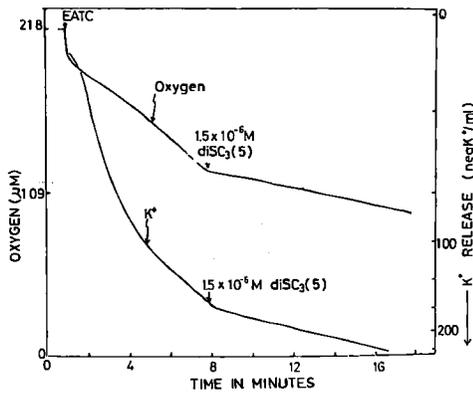


図-9. EATCの Ca<sup>++</sup> 依存性 K<sup>+</sup> 遊出におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
EATC (0.70 X 10<sup>7</sup> cells/ml) と同じ実験条件で測定した。なお、K<sup>+</sup> 変化は K<sup>+</sup> 電極にて測定した。

み、すなわち、DNA の取り込みは、15 μM の濃度で阻害されている。

以上のいずれの実験結果も細胞が ATP に依存する現象を阻害することを示し、これが ATP 量の変化、または、ATP 利用系の阻害のいずれかによることが考えられる。

6. dis-C<sub>3</sub>(5)の EATC の ATPase および ATP 含有量に対する作用

このような理由から、ATP 分解作用におよぼす dis-

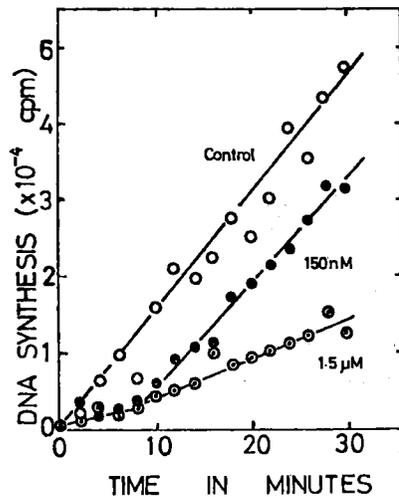


図-11. EATCの DNA 合成におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
EATC (1 x 10<sup>7</sup> cells/ml) の 10% FCS 加 Eagle MEM 中に、<sup>3</sup>H-Thymidine (1 μCi/ml) を加え、37°C で保温した。  
反応後、上記の液で 3 回洗浄し、酸不溶性分画中の <sup>3</sup>H-TdR を計測した。

C<sub>3</sub>(5)の効果を明らかにするため人赤血球膜ゴーストの Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase 活性におよぼす作用を検索した。結果は表-2に示すごとく、このATPase 活性に

表-2. 人赤血球膜ATPaseにおよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の効果

	pi/mg protein/hr	per cent inhibition
No addition	0.61	0
Cyanine dye (2 × 10 <sup>-6</sup> M)	0.58	5.3
Cepharanthine (5 × 10 <sup>-5</sup> M)	0.49	18.5
Ouabaine (1 × 10 <sup>-4</sup> M)	0.32	46.3
Oligomycin (10 μg/ml)	0.40	22.8

対してはウアバインが強い阻害作用を示すことはもちろんであるが、オリゴマイシンや膜安定化作用のあるセファランチンにも阻害作用が認められる。しかし、dis-C<sub>3</sub>(5)はこのNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase に対して統計的な差はなく、これが内在呼吸の阻害を説明するほど大きくはないことが明らかにされた。

この様な結果から、dis-C<sub>3</sub>(5)がもたらす今一つの可能性、すなわちATP 含量の低下について測定した。Dowex-1 カラムクロマトグラフィーによって定量されたEATCのATP, ADP量について示すと表-3の如くである。

すなわち、内在呼吸はNaF添加で約17%ATP量を下するが、NaF存在下のオリゴマイシン添加では80%、dis-C<sub>3</sub>(5)添加では71%ATP含量が低下し、ATP/ADP比は37°C、20分反応条件下で1.1のものが、それぞれ0.11、0.20と極めて低下している。このことは、先に示されたdis-C<sub>3</sub>(5)によるATP依存性反応の低下がdis-C<sub>3</sub>(5)のATP含有量の低下によって

起きたことを示すと考えられる。

7. dis-C<sub>3</sub>(5)のミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する作用

これまでの結果は、dis-C<sub>3</sub>(5)がオリゴマイシン様作用と呼吸鎖阻害様の作用の2つの作用を示す様に見える。この作用機構を解析するためラット肝よりHogeboom-Schneiderの変法<sup>10)</sup>により、遠心分離によって分画されたミトコンドリアのエネルギー転換反応に対するdis-C<sub>3</sub>(5)の作用について検討した。

すなわち、図-12に示す様に、0.2-0.4 μM の濃

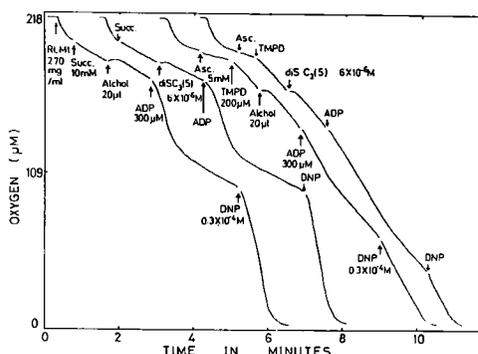


図-12. RLMTのコハク酸ならびにアスコルビン酸酸化におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
RLMT 2.70mg protein/ml で、実験条件は図-2と同じ。

度においてはNAD連鎖の電子伝達反応にのみADPのリン酸化呼吸もDNP開放呼吸も阻害され、コハク酸やアスコルビン酸酸化の呼吸に対しては10倍以上の高濃度、2-20 μMにおいてわずかの呼吸阻害が認められるにすぎない。しかも、EATCの呼吸阻

Inhibitor	ATP (n moles/10 <sup>7</sup> cells)	ADP & AMP (n moles/10 <sup>7</sup> cells)	ATP/ADP
None	104.8	94.3	1.11
NaF (10mM)	87.0	114.7	0.76
NaF + Oligomycin (1 μg/ml)	21.5	193.0	0.11
NaF + dis-C <sub>3</sub> (5) (150nM)	31.2	155.6	0.20

表-3. EATCのアデニンヌクレオチド量におよぼす dis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
EATCのKRP懸濁液(3 ml)中に薬物を加え、37°Cで20分間保温した。反応後、凍結融解操作を施し、1.5N PCA抽出酸可溶性分画を1.5N KOHで中和し、Dowex-1(Cl type)のカラムクロマトにより分画し、260nmの吸光度より定量した。

害に必要な  $\text{dis-C}_3(5)$  の量はグルタミン酸を呼吸基質にしたミトコンドリアの呼吸阻害のための  $\text{dis-C}_3(5)$  の要求量より更に小さい(図-13)。このことは  $\text{dis-}$

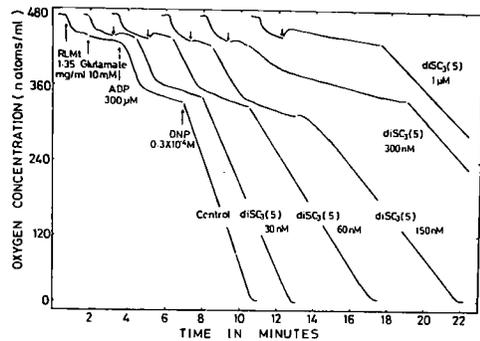


図-13. RLMtのグルタミン酸酸化におよぼす  $\text{dis-C}_3(5)$  の効果

RLMt 2.70mg protein/mlで実験条件は図-2と同じ。

$\text{C}_3(5)$ が膜電位測定用の試薬として使用される事からも明らかな如く、 $\text{dis-C}_3(5)$ は細胞膜電位に依存して積極的に細胞内に蓄積し、細胞内での濃度が懸濁液よりも増大していることを示唆する。

これらの結果から  $\text{dis-C}_3(5)$ は少なくとも  $0.5 \mu\text{M}$  の低濃度においてはミトコンドリアの呼吸鎖、特にロテノン感受性部位を阻害していると結論される。

しかし、この阻害作用にはなお不明な点がある。すなわち、図-14に示すごとくグルタミン酸を基質

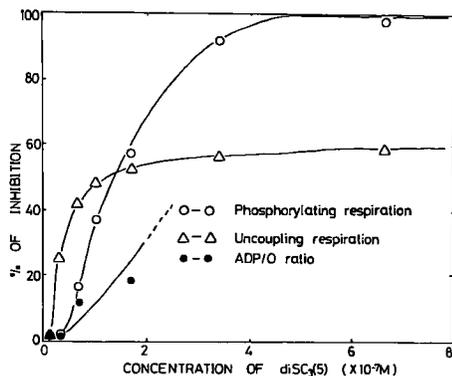


図-14. RLMtのグルタミン酸におよぼす  $\text{dis-C}_3(5)$  の呼吸阻害度

図-13の結果をまとめた。

とした DNP 開放呼吸と  $\text{ADP}+\text{Pi}$  のリン酸化呼吸に対する  $\text{dis-C}_3(5)$  の阻害度が濃度によってかなり著しく異なり、特にリン酸化呼吸の阻害が大きい。このことは、 $\text{dis-C}_3(5)$  がミトコンドリアの他のエネルギー転換反応を阻害している可能性を示唆する。この問題を解析するためミトコンドリアの  $\text{Mg}^{++}$  及び DNP-ATPase 活性に対する  $\text{dis-C}_3(5)$  の作用について検討を加えた。表-4はその結果を示す。すなわち、 $\text{dis-C}_3(5)$  はかなり微量の  $20 \text{ nM}$  から濃度に依存して、 $\text{Mg}^{++}$  ATPase 活性を促進し、 $2 \mu\text{M}$  においては約4倍の  $\text{Mg}^{++}$  ATPase の促進を示している。このことは、 $\text{dis-C}_3(5)$  にオリゴマイシン様のリン酸化阻害作用というよりはむしろ脱共役作用のあることを示すものである。

なお、図-15の如くピルビン酸、リンゴ酸を基質とした  $\text{ADP}+\text{Pi}$  のリン酸化呼吸はグルタミン酸を基質としたそれにおよぼす  $\text{dis-C}_3(5)$  の阻害度とよく類似していたが DNP による開放呼吸におよぼす阻害は認められない。この点に関しては現在検索中である。

ミトコンドリアの電子伝達系とエネルギー転換反応の解析において特に NDP 連鎖呼吸、コハク酸酸化呼吸の関係は、コハク酸酸化に伴うエネルギー産生とそれによるコハク酸からの NAD への電子逆流を調べることにより、かなり色々な情報を得ることが可能である。このような意味で、ラット肝分離ミトコンドリアのコハク酸による NAD の還元反応や、それに共役したエネルギー代謝、特に ADP のリン酸化や  $\text{Ca}^{++}$  輸送に対する  $\text{dis-C}_3(5)$  の作用について検討した結果、図-16に示す様な結果を得た。すなわち、ミトコンドリア内 NAD はコハク酸で著しく還元されるが  $\text{dis-C}_3(5)$  はその電子逆流を一部阻害する。また、ADP はそのリン酸化に伴い NADH は酸化されるが、 $\text{dis-C}_3(5)$  存在下には全くその酸化は認められない。しかし、 $\text{Ca}^{++}$  の能動輸送による NADH の酸化と還元反応は  $\text{dis-C}_3(5)$  存在下にもよく観察される。このことは  $\text{dis-C}_3(5)$  がロテノン様の呼吸鎖阻害を示すと同時に ADP のリン酸化反応に対しても阻害的であり、 $\text{Ca}^{++}$  能動輸送にはあまり関係していないことを示し、現在知られているエネルギー転換反応阻害剤とはかなり異なった作用をもっている。

#### 8. EATC 担癌動物との $\text{dis-C}_3(5)$ 投与による EATC の内在呼吸変化

以上の如く癌細胞は他の正常細胞に比して高い内在呼吸をもち、その活性はクラビトリ-効果に代表

表-4. RLMtのDNP-ATPaseならびにMg<sup>2+</sup>-ATPase活性におよぼすdis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
 DNPならびにMgCl<sub>2</sub>の最終濃度は、各々1.25x10<sup>-5</sup>M, 5x10<sup>-3</sup>Mで測定した。

dis-C <sub>3</sub> (5) (x 10 <sup>-8</sup> M)	ATPase activity (n moles/mg/10min.)			
	DNP-ATPase	Relative rate	Mg <sup>2+</sup> -ATPase	Relative rate
No addition	791	1.0	62	1.0
2	871	1.1	101	1.6
6	860	1.1	132	2.1
20	943	1.2	187	3.0
60	959	1.2	245	4.0
200	915	1.2	271	4.4

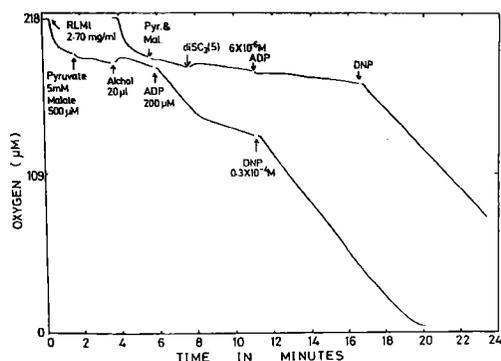


図-15. RLMtのピルビン酸+リンゴ酸酸化におよぼすdis-C<sub>3</sub>(5)の効果  
 RLMt 2.70mg protein/mlで実験条件は、図-2と同じ。

される如く、糖添加により特異的な内在呼吸の低下をもたらす。このような特異性の高い内在呼吸はほとんど細胞内ADPのリン酸化によるものでミトコンドリアのリン酸化呼吸にほかならないが、膜電位試薬dis-C<sub>3</sub>(5)は極めて微量で特異的にその呼吸を阻害することから、in vivoでの生物作用が注目される。この様な意味でEATC担癌マウスの腹腔内に50μg/ml dis-C<sub>3</sub>(5)を0.5ml/mouse注射し、24時間後に腹水細胞を取り出してその内在呼吸活性について解析を試みた。

結果は、図-17に示す如く内在呼吸85%とかなり強く阻害されており、この阻害呼吸はin vitroの実験に認められた如く、バリノマイシン、FCCP、DNP

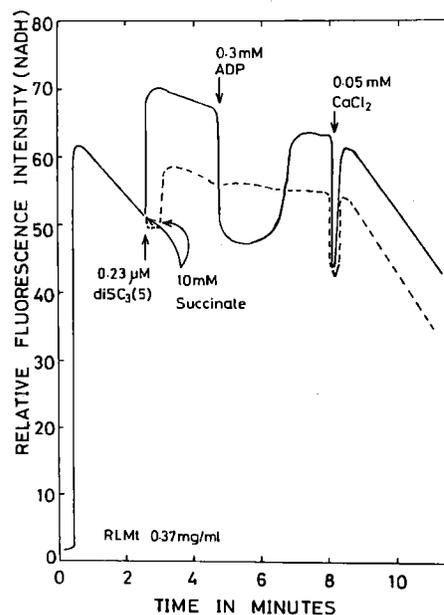


図-16. RLMtの電子逆流におよぼすdis-C<sub>3</sub>(5)の効果

RLMT (0.37mg protein/ml)を島津製螢光分光光度計(RF510)を用い460nmの螢光変化より、NADHの変化量を測定した。なお、励起光は340nmを用いた。

等で再び解放される。

従ってdis-C<sub>3</sub>(5)によるEATC内在呼吸阻害はin vitroでもin vivoでも認められ、癌細胞に特有なこ

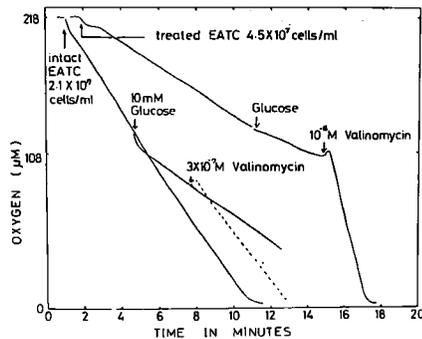


図-17. EATC 担癌マウスへの dis-C<sub>3</sub>(5)投与による EATC の内在呼吸変化  
dis-C<sub>3</sub>(5) (50μg/ml) を 0.5ml/mouse で腹腔内に注射した後24時間経て採取した EATC について、図-1 と同じ実験条件で行った。

の高い内在呼吸が阻害されることから、癌細胞代謝障害が予期される。

9. EATC 担癌マウスの dis-C<sub>3</sub>(5)による延命効果について。

dis-C<sub>3</sub>(5)の in vivo EATC に対する内在呼吸阻害作用が示されることからそれが EATC 移植後の担癌マウス生存日数を延長させ可能性を示唆する。事実、30μg/mouse/day, dis-C<sub>3</sub>(5)の腹腔内投与15日間によってはほとんどその体重変化に対し影響などが認められない。しかし、移植後3日目から担癌マウスに同じ30μg/mouse/dayの投与によっては dis-C<sub>3</sub>(5)投与後5日~7日で死にいたらしめる(図-18)。

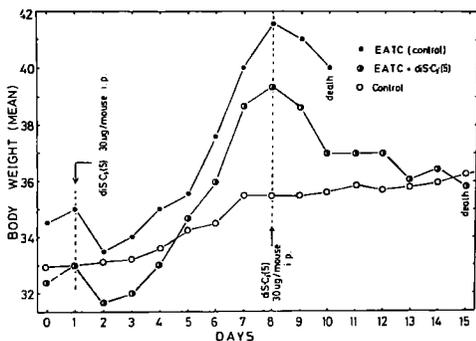


図-18. EATC 担癌マウスの dis-C<sub>3</sub>(5)による延命効果  
第1日目に10<sup>6</sup>cells/mouseで EATC を移植し、2日目と9日目に dis-C<sub>3</sub>(5)30μg/mouse を腹腔内注射した。

しかし、EATC (10<sup>6</sup>cells/mouse) 移植後1日目から dis-C<sub>3</sub>(5)を30μg/mouse/day投与する時、対照の生理的食塩水を投与したものより150%延命を認めることがあるが、死亡した担癌マウスはやや EATC が腹水中に多量貯留し、かつ腹壁や EATC はすべて dis-C<sub>3</sub>(5)で緑色となっている。もちろんこのような EATC の内在呼吸は完全に阻害され、呼吸に依存した ATP 合成能は著しく低下している。

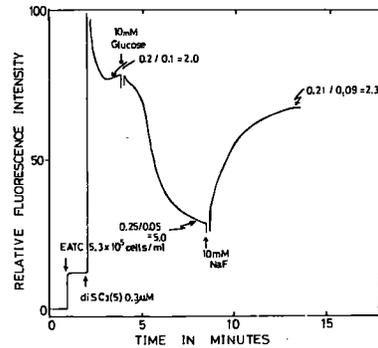


図-19. EATC の膜電位変化と dis-C<sub>3</sub>(5)の結合量中の比は、結合型/遊離型の比を示している。

考 察

癌細胞の高い内在呼吸や糖添加に伴う呼吸活性低下で知られるクラビトリ-効果は Morris 最小偏奇癌でこれらの現象がみられなかったため、従ってそれは癌細胞の特性として認められないという発見<sup>6)</sup>に伴って、現在ではこれに関する研究は極めて数少なくなった。しかし、細胞が周囲の調節を無視して無限に増殖する以上、当然そのエネルギー源を必要とし、解糖や呼吸活性に依存したエネルギー活性機構の亢進が細胞増殖度や悪性度と深い関係にあることは事実<sup>22)23)</sup>であり、また、最近の進歩した技術による新しい解析によっては細胞の悪性形質転換がこのエネルギー代謝調節機構にも変化を与えていることが示唆される。この様な理由から、古くから知られているこの悪性癌細胞のもつ性質の解析を特に細胞膜電位変化と関係して行ない、クラビトリ-効果に伴って細胞膜電位がかなり著しく変化し、また、膜電位変化によってクラビトリ-効果も若干の影響を受けることが明らかにされた。また膜電位変化測定プローブの一種 dis-C<sub>3</sub>(5)が強い内在呼吸阻害作用を示し、EATC のエネルギー代謝依存性の現象を著

しく阻害することも明らかにされた。この原因には EATC の細胞内ミトコンドリアの電子伝達やリン酸化反応への作用が考えられるが、ラット肝分離ミトコンドリアを用いた解析から dis-C<sub>3</sub>(5)は電子伝達反応系のロテノン感受性部位の阻害と、Mg<sup>++</sup>ATPase 活性を促進する作用と、特にそれはリン酸化部位としての 1st site が著しく阻害されるためであることを明らかにした。従って、EATC で見られた dis-C<sub>3</sub>(5) による ATP 依存性の反応が阻害されるのは、内在呼吸、特にミトコンドリアにおけるリン酸化サイトの 1st step の阻害に基づく ATP 含有量の低下が 1 つの重要な因子であることは明らかである。次に dis-C<sub>3</sub>(5)の螢光変化は何を示すのかという問題がある。今この dis-C<sub>3</sub>(5)の膜電位変化に依存した螢光変化を、細胞にグルコースを添加した時示される変化と、ミトコンドリアで呼吸基質や ATP 添加で示される変化とを比較してみると、その相互間には異なった反応がみられる。従って目下細胞レベルで示される dis-C<sub>3</sub>(5)の螢光が細胞膜電位を反映しているのか<sup>24)25)</sup>、または細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝に依存した膜電位を反映しているのか<sup>26)</sup>、明らかでない。もちろん一部はミトコンドリア膜の電位変化を反映していると考えられるが、図-19 に示す如く EATC の膜電位変化に依存すると考えられる色素の細胞内外への移動が示され、この変化には細胞膜電位がかなり強く反映されていることがうかがわれる。この問題については Åkerman<sup>27)</sup> はサフラニンを用いた吸光変化からミトコンドリアのエネルギー転換が主体となると考えているが、彼のデータはそれを説明するに充分でない。

また、dis-C<sub>3</sub>(5)が EATC の内在呼吸阻害を示し、それがミトコンドリアに対する作用よりかなり強く、この色素が細胞膜電位に依存して細胞内に濃縮していることは、その取り込みからも明らかである。従って今後この色素の様に膜電位を利用して細胞内に物質を取り込ませ、それによって細胞代謝を特異的に変化させる方法の開発が考えられる。事実 dis-C<sub>3</sub>(5)を EATC 担癌マウス腹腔内に注入すると、ほとんどその色素は細胞内に取り込まれ腹腔液中には色素の残存量は極めて少ない。しかも投与 24 時間後においてなお腹水癌細胞の内在呼吸は 85% 以上阻害されていて、これが癌細胞の代謝を著しく阻んでいることは明らかである。しかも癌細胞の内在呼吸は他の細胞に比して高い解糖と高い内在呼吸活性を持ち、本実験からも明らかなる如くその呼吸のほとんどは A-

TP 合成のためのミトコンドリアにおける共役したリン酸化呼吸にほかならない。従ってこの内在呼吸をかなり特異的に阻害する dis-C<sub>3</sub>(5)は今後癌細胞のエネルギー代謝の解析に役立つのみならず、治療効果についても有効な作用が予期される。この様な目的で予備実験を行なったところでは、使用法にかなり困難な点があるが、一部延命効果も認められている。ただ、大量ではかなり正常細胞に対しても毒性が示され、今後、正常細胞に対する毒性を解決しなければならない問題が残されている。

## 結 論

癌細胞における高い解糖性と高い内在呼吸の解析は、最近の新しい生物学的手法により、再び問題視されるようになってきている。本研究では、この問題を細胞膜電位と解糖機構の相関性に注目して実験し、エールリッヒ腹水癌細胞が解糖に依存して膜電位変化を示すこと、また、それに伴ってその膜電位プロープの一種 dis-C<sub>3</sub>(5)が膜電位に依存して細胞内に取り込まれ、蓄積し、EATC の内在呼吸を著しく阻害することを明らかにした。

それらに関する結果は次の如くである。

1. EATC は糖添加により膜電位差の増大がもたらされる。
2. 膜電位測定試薬 dis-C<sub>3</sub>(5)は EATC の膜電位に依存して細胞に取り込まれ、内在呼吸を 100 μM の濃度で 85% 以上阻害する。この内在呼吸は細胞内ミトコンドリアの ADP リン酸化共役呼吸が主体であり、従って細胞内 ATP レベルは著しく低下させられる。
3. 内在呼吸阻害の原因を分離肝ミトコンドリアで検索した結果、dis-C<sub>3</sub>(5)はミトコンドリアの呼吸系のロテノン感受性部位を一部阻害し、Mg<sup>++</sup>ATPase 活性を促進するが、それはリン酸化サイトの 1st site を阻害するためである。
4. EATC の内在呼吸阻害は担癌マウス腹腔内投与後 24 時間の細胞でも認められ、癌細胞のエネルギー代謝を特に著しく傷害することが示唆される。
5. これらの結果に立脚し、EATC 担癌マウス腹腔内への dis-C<sub>3</sub>(5)の投与により、若干の担癌マウスの延命が認められる。
6. また、膜電位を利用した物質の細胞内投与法は、今後薬物開発に注目されなければならない問題であることを提起した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜わった関場香 謝意を表します。  
教授及び、高知医科大学生物学内海耕髓教授に深甚なる

### 文 献

1. Aisenberg, A. C.: Regulatory mechanisms in respiration and glycolysis. In *the Glycolysis and Respiration of Tumors*, Academic Press, New York & London, pp. 159-180, 1961.
2. Wenner, C. E.: Progress in tumor enzymology. *Adv. Enzymol.* **29**, 321-390, 1967.
3. Koobs, D. H.: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* **178**, 127-133, 1972.
4. Racker, E.: History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell Biochem.* **5**, 17-23, 1974.
5. Weber, G.: Behavior of liver enzymes in hepatocarcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **6**, 403-494, 1961.
6. Weber, G., Morris, H. P., Love, W. C. and Ashmore, J.: Comparative biochemistry of hepatomas. II. Isotope studies of carbohydrate metabolism in Morris hepatoma 5123. *Cancer Res.* **21**, 1406-1411, 1961.
7. Carroll, R. C., Ash, J. F., Vogt, P. K. and Singer S. d Singer S. J.: Reversion of transformed glycolysis to normal by inhibition of protein synthesis in rat kidney cells infected with temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, pp. 5015-5019, 1978.
8. Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119-130, 1963.
9. Hogeboom, G. H.: Fractionation of cell components of animal tissues. *Method Enzymol.* **1**, 16-19, 1955.
10. Hoffman, J. F. and Laris, P. C.: Determination of membrane potentials in human and amphiuma red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* **239**, 519-552, 1974.
11. 内海耕髓, 宮原正信: 螢光色素の生化学研究への応用. 化学の領域 (増刊114号) pp.97-107, 1976.
12. 高橋泰常: 組織中無機磷貨値と Creatine 磷酸の定量法, 及び豚精子の Phosphoamidase, Creatine Phosphokinase 作用について. 生化学 **26**, 690-698, 1955.
13. Pressman, B. C. and Lange, J.: Intramitochondrial nucleotides. I. Some factors affecting net interconversions of adenine nucleotides. *J. Biol.* **232**, 967-978, 1958.
14. Uyeda, K. and Racker, E.: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **240**, 4682-4688, 1965.
15. Uyeda, K. and Racker, E.: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VIII. The regulatory function of phosphate in glycolysis. *J. Biol. Chem.* **240**, 4689-4693, 1965.
16. Currie, W. D. and Gregg, C. T.: Inhibition of the respiration of cultured mammalian cells by oligomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 9-15, 1965.
17. Hoeven, R. P. V., Blitterswijk, W. J. V. and Emmelot, P.: Fluorescence polarization measurements on normal and tumor cells and their corresponding plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **551**, 44-54, 1979.
18. Jasaitis, A. A., Kuliene, V. V. and Skulachev, V. P.: Anilino-naphthalenesulfonate fluorescence changes induced by non-enzymatic generation of membrane potential in mitochondria and submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 177-181, 1971.
19. Azzi, A., Gherardini, P. and Santato, M.: Fluorochrome interaction with the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **246**, 2035-2042, 1971.

20. Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C. and Hoffman, J. F.: Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **13**, 3315–3330, 1974.
21. Simons, T. J. B.: Calcium-dependent potassium exchange in human red cell ghosts. *J. physiol.* **256**, 227–244, 1976.
22. Burk, D., Woods, M. and Hunter, J.: On the significance of glycolysis for cancer growth, with special reference to Morris rat hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **38**, 839–863, 1967.
23. Sweeney, M. J., Ashmore, J., Morris, H. P. and Weber, G.: Comparative biochemistry of hepatomas. IV. Isotope studies of glucose and fructose metabolism in liver tumors of different growth rates. *Cancer Res.* **23**, 995–1002, 1963.
24. Laris, P. C., Perchadsingh, H. A. and Johnstone, R. M.: Monitoring membrane potentials in Ehrlich ascites tumor cells by means of a fluorescent dye. *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 475–488, 1976.
25. Burchkhardt, T.: Non-linear relationship between fluorescence and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **468**, 227–237, 1977.
26. Laris, P. C., Bahr, D. P. and Chaffee, R. R. J.: Membrane potentials in mitochondrial preparations as measured by means of a cyanine dye. *Biochim. Biophys. Acta* **376**, 415–425, 1975.
27. Åkerman, K. E. O.: Quantitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumor cells using the safranin method. *Biochim. Biophys. Acta* **546**, 341–347, 1979.

**Studies on the fluorescent dye, diS-C<sub>3</sub>-(5):  
monitoring of membrane potentials and inhibition of endogenous respiration  
in Ehrlich ascites tumor cells**

**Jitsuo AKIYAMA**

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School,

Okayama

(Director : Prof. K. Sekiba)

Changes in fluorescent intensity of the cyanine dye, 3,3'-dipropyl-2,2'-thiodicarbocyanine iodide [diS-C<sub>3</sub>-(5)], were monitored in Ehrlich ascites tumor cells (EATC) in correlation with glycolytic energy metabolism and endogenous respiration. After addition of glucose to EATC, membrane potentials monitored by diS-C<sub>3</sub>-(5) increased. The cyanine dyes were incorporated into EATC in proportion to the membrane potentials, and inhibited the endogenous respiration of EATC by more than 85% at a concentration of 100  $\mu$ M. The inhibited respiration was partially released by addition of an uncoupler of oxidative phosphorylation (DNP). The respiratory activity of NAD-linked substrates in mitochondria (2.7 mg protein/ml) was also inhibited by diS-C<sub>3</sub>-(5), which inhibited the Rotenone-sensitive sites of the respiratory chains (Site 1) and increased Mg<sup>++</sup>ATPase activity. The inhibition by diS-C<sub>3</sub>-(5) of endogenous respiration in EATC *in vivo* was also effective even 24 hours after administration of the dye into the peritoneal cavity. The mean survival times of EATC-bearing mice were significantly prolonged by the administration of diS-C<sub>3</sub>-(5). The data suggest that the cell membrane potential is a useful factor when administering therapeutic drugs into target cells.