

## がん化にともなう細胞膜性質の変化

金沢大学医学部第二病理学講座(主任：石川大刀雄教授)

滝田 大吉郎

(昭和47年9月20日受付)

一般に動物細胞の形質膜は、外部環境と細胞内部を隔離し、必要物質の選択的摂取を行ない、さらに細胞内活性の制御、隣接細胞相互の機能調節にも関与している。近年、がん細胞にみられる極性の消失、自律的増殖や浸潤、転移性、移植性ならびに抗原性の変化などの細胞生物々理学的諸性質も、形質膜の変化に関連するものとして、検討が加えられて来た。

一方、生体に生物々理学的研究の一手段である電気を応用し、生体の電気現象を捕えて生体の機能を研究する試みが、古くから行なわれている。Bernstein<sup>1)</sup>は神経、筋などの興奮性細胞は特殊な透過能をもつ細胞膜からなると考え、静止電位、活動電位の成り立ちについて、membrane theoryを打ち立てた。また小腸の粘膜細胞にみられるように、グルコース、アミノ酸の取り込みに伴う電位発生など、興奮性膜のみならず、非興奮性細胞膜における静止電位の意義が注目されている。

がん化細胞の電氣的測定は、最初、がん細胞と正常細胞とを静止膜電位の測定により区別する意図から、Lashら<sup>2)</sup>により子宮頸部がんについて行なわれた。その後、胃癌<sup>3)</sup>、皮ふ癌<sup>4)</sup>、および動物 Ehrlich 腹水肝癌<sup>5)~8)</sup>など動物細胞がんについて、多くの測定がなされた。しかしその測定値は、第1表に見る如く、必ずしも一様でなく、がん細胞個々の電位変動幅が大きく、また一般にがん細胞では正常細胞に比して、静止膜電位は低下するが、明確な判定規準とはなり得なかった。

また Aull<sup>6)</sup>は、がん細胞の膜性質とくに能動透過性を中心として、これを検討した。

静止膜電位の成因については、なお定説はないが、興奮性膜におけるとほぼ同じ機転で成り立つとすると、静止膜電位は次の式に従うはずである。

$$E = \frac{RT}{F} \log_e \left[ \frac{PK(K)_i + PNa(Na)_i + PCl(Cl)_o}{PK(K)_o + PNa(Na)_o + PCl(Cl)_i} \right]$$

すなわち、上式によると、膜の静止電位は細胞内と外部のイオン(K, Na, Clなど)に関係するものと考えてよい<sup>9)</sup>。

興奮性細胞において、Hodgkinら<sup>10)11)</sup>によれば、PK:PNa:PCl=1:0.04:0.45であるという。

Aull<sup>6)</sup>はマウス Ehrlich 腹水がんでは、興奮性細胞と異なり、PNa, PCl ≧ PKであると報告している。同じ腹水がんでも、松井ら<sup>12)</sup>によって報告されたMH 134の測定では、PK > PNaであるという。

このように、がん細胞では、同じ上皮性由来と考えられる細胞でも、静止膜電位は、それぞれに全く異なり、また一様な結果が得られていない。

第1表 文献に見られるがん細胞の静止膜電位

細胞	静止膜電位(mV)
人子宮上皮 (Lashら)	-33(-20~-48)
子宮癌 ( " )	-22(-19~-27)
人胃粘膜 (森岡)	-55.1~-52.3
胃癌 ( " )	-56.9~-54.8
人皮膚癌 (森岡ら)	-65.7±1.2
弘前肉腫 (中村ら)	-10. ±23.9
マウスEhrlich腹水癌(Johnston)	+5 ~+10
" (Tanaka)	-70.4± 4.1
" (Sekiya)	-16.9± 0.5
" (Aull)	-11.2± 0.29
マウスC3HMH134 (松井ら)	-39.02 ± 1.73
" (菅野ら)	-25.9± 2.1

The changes of characteristics of cell membrane by malignant transformation.  
**Daikichiro Takida**, Department of Pathology (II) (Director : Prof. T. Ishikawa),  
 School of Medicine, Kanazawa University.

以上のように、がん化細胞における膜静止電位や、そのイオン能動透過性の不規則性は、一つはがん化細胞における分化度の差異によるものと考えられるが、その多くは各報告者における測定材料の不均一なことも考慮される必要があろう。

この点を考慮して、人子宮頸部がんである HeLa 細胞を規準にして、人胎児肺組織由来の PHEL 細胞およびその試験管内がん化細胞 THEL 細胞、その virus 感染細胞である THEL-HVJ 細胞、マウス fibroblast 由来の L 細胞およびその試験管内がん化細胞である LD<sub>2</sub> 細胞、Lost 細胞など、起原を同じくする正常あるいはそのがん化細胞について、細胞膜の静止電位測定を中心として、また同時に小田島ら<sup>9)</sup>の方法に従って、がん化細胞における膜抵抗測定を行ない、細胞の膜性質の変化を検討した。

### 実験材料および実験方法

#### I. 培養細胞

##### 1. HeLa 細胞

本実験に使用した HeLa 細胞は、よく知られている如く、子宮頸部癌由来の上皮性悪性腫瘍細胞で、本学がん研ウイルス部で継代培養しているものである。

##### 2. 正常人胎児肺初代培養 (PHEL)、およびその試験管内がん化細胞 (THEL, THEL-HVJ)

PHEL 細胞 (Primary Human Embryonic Lung Cells) は、波多野ら<sup>13)</sup>によって樹立された正常人胎児肺初代培養細胞で、20代前後まで継代可能なもので、典型的な fibroblast 様の形態を示す。THEL 細胞は、PHEL 細胞を継代培養中に20代前後で spontaneous malignant transformation を起こし、以後継代可能となったものである。<sup>14)</sup> hamster 接種による oncogenicity の検討では<sup>15)</sup>、PHEL 細胞では non-oncogenic であるのに反し、THEL 細胞は strongly oncogenic であり、病理組織学的には sarcoma の像を示す。THEL-HVJ 細胞は、THEL 細胞に HVJ virus を感染させたもので、形態、増殖態度は THEL 細胞と全く同様であるが、この細胞についての波多野ら<sup>13)</sup>の実験によると、その造腫瘍性は、THEL 細胞に比して約 1/10 以下に低下しており、また cell injuring reaction (CIR) でもその反応性の増強が観察されている。

##### 3. L 細胞およびその試験管内がん化細胞 (LD<sub>2</sub>, Lost)

L 細胞は C3H/He $\lambda$  の fibroblast 由来の継代培養細胞で、井上ら<sup>16)</sup>が継代培養しているものである。LD<sub>2</sub> 細胞および Lost 細胞は Ehrlich 腹水がん細

胞および高瀬ら<sup>17)</sup>が Sr<sup>89</sup> で誘導した骨肉腫から、井上ら<sup>16)</sup>が核酸材料を抽出し、それらを同じマウス由来の培養 L 細胞に加えて、1~10日間培養し、試験管内発癌に成功したものである。これらの試験管内がん化細胞は、いずれも C3H 新生児マウス背部皮下に接種すると、腫瘍の発現がみられ、病理組織像は sarcoma で、強い転移形成能を有している。本実験に用いられた LD<sub>2</sub> 細胞、Lost 細胞はすべて C3H マウスに接種して形成された腫瘍を剔出、trypsinization<sup>18)</sup> し、ふたたび継代培養したものである。

#### II. 培養

培養液はすべて Eagle 液に 10% の割合に仔牛血清を加えたものを用いた。1.5×1.5×3.0cm の小角瓶に入れたカバーガラス上に 37°C で単層静置培養を行ない、2~3 日後 contact inhibition のない状態の各細胞を用いるようにした。

#### III. 電気生理学的測定

##### 1. 微小電極

微小電極は、尖端直径 1~0.5 $\mu$  以下の pyrex 毛細管ピペットに 3M 塩化カリ溶液を充填したもので、Tyrode 液中での尖端電位が 2.0mV 以下、直流抵抗はほとんどが 10~30M $\Omega$  を示した。

##### 2. 測定用培養容器および微小電極の細胞内刺入操作

培養細胞測定用培養容器として、厚さ 1.0mm のプラスチック板の中央に 20mm×35mm×2.0mm の培養容器を作り、その中にカバーガラス上に培養した細胞を入れ、培養容器には、実験の目的に応じた溶液を満たし、室温 (25°C) で 10~30分 incubation した。個々の細胞を位相差顕微鏡で観察しつつ、油圧式マイクロマニプレーター (高島製) によって微小電極を細胞内に刺入した。

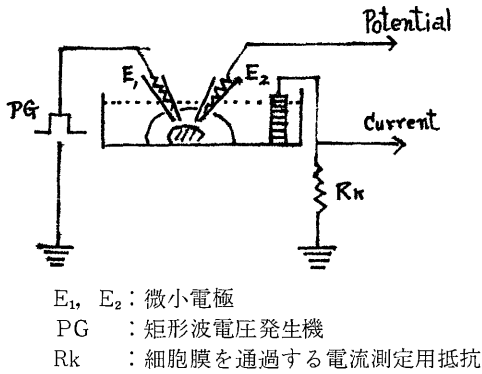
##### 3. 静止膜電位の測定

微小電極から導びかれた電位を、高入力インピーダンス・カソードフォロワー前置増幅器 (日本光電 MZ-3) を介して、ペンレコーダーおよびブラウン管オシロスコープ (日本光電製 VC-7) で観察した。

##### 4. 膜抵抗の測定

第 1 図は細胞の膜抵抗測定装置のブロックダイアグラムである。すなわち medium 中の 1 個の細胞に 2 本の微小電極を刺入し、1 本の微小電極から矩形波電圧を 500msec 負荷し、膜における電位変化は、他の微小電極から高入力インピーダンス・カソードフォロワー前置増幅器を介して、ペンレコーダーおよびブラウン管オシロスコープで観察した。また膜を通しての電流は R<sub>K</sub> における電位変化から計算された。

第1図 膜抵抗測定装置の Block diagram



実験成績

I. 予備実験

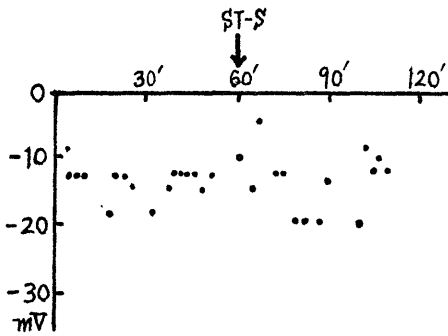
まず、培養 medium 中における細胞膜静止電位の安定性を確認するために、次の実験を行なった。

細胞を室温 (25°C) 中で位相差顕微鏡に設置した電位測定用容器の中に置き、経時的な電位を観察した。第2、3、4、5図にみられるように、各細胞とも比較的安定した静止膜電位を示した。この細胞に波多野ら<sup>13)</sup>の cell injuring reaction に用いられた

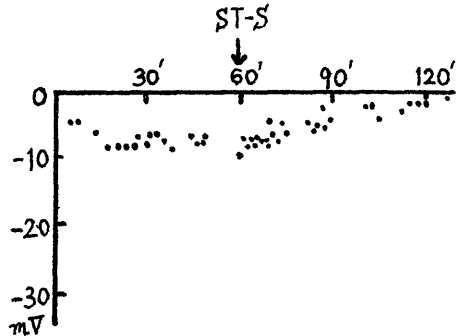
Streptolysin S(PCB-45) などの特異的がん細胞障害物を添加すると、非がん細胞であるL細胞ではほとんど電位の変化はみられないが、LD<sub>2</sub>細胞、LD<sub>1</sub>細胞(LD<sub>2</sub>細胞のC3Hマウス接種を經過していないもの)および HeLa 細胞では、添加後30分の間に徐

第2~5図 S'treptolysin S 添加時の細胞膜静止電位

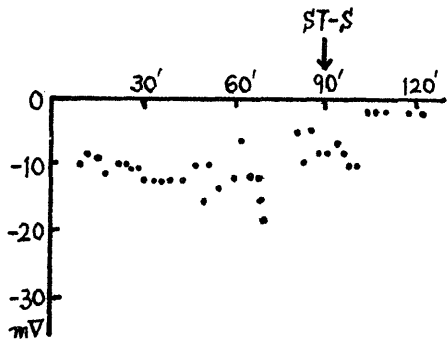
第2図 L 細胞



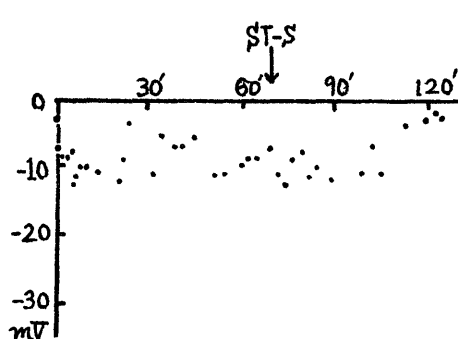
第4図 LD<sub>2</sub>細胞



第3図 LD<sub>1</sub>細胞



第5図 HeLa細胞



々に電位の低下がみとめられた。従って、この予備実験の結果から、各細胞は室温中で比較的に安定した静止膜電位を保持し、細胞膜障害によってその電位が減少、消失することが確認された。

II. 細胞膜の静止電位

第6図はL細胞の細胞膜静止電位の測定例である。その静止電位の時間に対する変化が3種類に分けられる。微小電極が細胞に刺入されると同時に、電位は負側に振れ、刺入中は振れの大きさに著しい変化がみられず、微小電極の引抜きと同時に、電位は基線にもどるA型。同じ細胞系でも、微小電極が細胞に刺入された時に示した電位が、時間の経過と共に、減少あるいは増加を呈するB型。測定対象とした培養細胞の静止膜電位は常に内側が負であるが、負電位の現われる直前に2~15mVの正電位が記録されるC型。これらの現象は細胞の種類、悪性化の有無によって量的の相違はあるが、いずれの細胞系でも認められた。特に第6図のBで示した例などは、微小電極刺入による細胞膜の損傷など人工的な要素を考慮しなければならないが、同じ細胞にくり返し電極を刺入しても、また微小電極の細胞内刺入部位を変えても、この現象が観察されることからして、細胞膜損傷による変化とは考え難い。第6図Cは HeLa 細胞の外側のNa イオン濃

度を急激にかえた時に観察されたものである。

第2表は各種培養細胞の細胞膜静止電位を示している。培養 medium (Eagle 液+10% calf serum) 中でカバーガラス上に培養された各細胞を Tyrode 液で十分に洗い、位相差倒立顕微鏡上に装置した電位測定用容器に入れ、約10分 incubate した後に電位を測定した。また、培養細胞の cell cycle を考慮して、あらかじめ細胞形態学的に、細胞の大きさ、核膜の存在、核小体、細胞質内の小器官の状態などにより、12種類の細胞を区別し、常に一定の大きさや構造を示すものを選んで電位を測定した。

1. 人培養がん細胞の典型例である HeLa 細胞の静止膜電位は  $-9.0 \pm 1.0 \text{ mV}$  で、比較的安定した電位を示した。

2. L細胞の細胞膜静止電位は  $-7.4 \pm 0.26 \text{ mV}$ 、そのがん化細胞LD<sub>2</sub>細胞、Lost 細胞の細胞膜静止電位は、それぞれ  $-10.0 \pm 3.0 \text{ mV}$ 、 $-7.0 \pm 3.5 \text{ mV}$  で、正常細胞であるL細胞に比し、僅かではあるが、静止膜電位は増大するが、その変動幅が著しく増大するのを認めた。

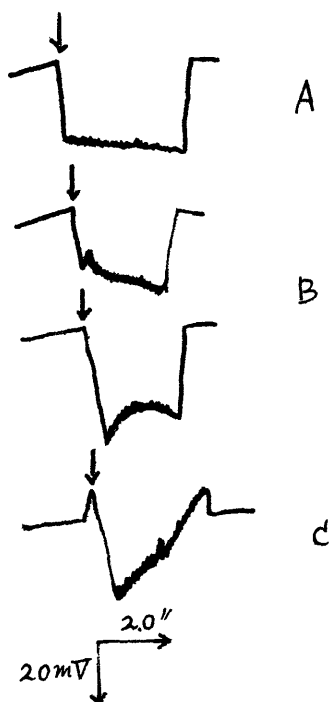
3. PHEL細胞の細胞膜静止電位は  $-5.25 \pm 0.6 \text{ mV}$ 、そのがん化細胞THEL細胞では  $-4.57 \pm 1.85 \text{ mV}$ 、また virus を感染させたTHEL-HVJ細胞では  $-1.87 \pm 0.6 \text{ mV}$  を示した。L細胞系に比してPHEL細胞系の方が、その絶対値が小さい。しかも細胞のがん化により絶対値の減少と変動幅の増大を認めた。

III. 細胞核の静止電位

細胞核の静止電位の測定技術および測定値の解析の上で、Kannoら<sup>19)~21)</sup>が指摘するようにいくつかの問題点がある。測定には細胞膜の静止電位測定の時と同じ形態の細胞を選んで使用した。

第7図は HeLa 細胞で測定したもので、400倍位相差顕微鏡で核を確認し、そのほぼ直上から微小電極

第6図 L細胞の細胞膜静止電位の測定例



第2表 細胞膜静止電位

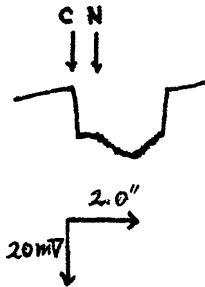
細胞	細胞膜静止電位(mV)
HeLa 細胞	$-9.0 \pm 1.0$
L 細胞	$-7.4 \pm 0.26$
LD <sub>2</sub> 細胞	$-10.0 \pm 3.0$
Lost 細胞	$-7.0 \pm 3.5$
PHEL 細胞	$-5.25 \pm 0.6$
THEL 細胞	$-4.57 \pm 1.85$
THEL-HVj 細胞	$-1.87 \pm 0.6$

を細胞内に刺入すると、まず、細胞膜静止電位が測定され、さらに深く微小電極を刺入すると、電位は増大を示した。細胞核から離れた部位では全くこのような現象は認められないことから、一応核の静止電位として取扱った。

第3表は HeLa 細胞, PHEL細胞およびそのがん化細胞の核静止電位の測定値である。

HeLa 細胞では  $-12.8 \pm 2.4$ mV, PHEL細胞では

第7図 HeLa 細胞の核膜静止電位測定例



第3表 核膜静止電位

細胞	核膜静止電位(mV)
HeLa 細胞	$-12.8 \pm 2.4$
PHEL 細胞	$-6.66 \pm 2.0$
THEL 細胞	$-4.85 \pm 2.5$
THEL-HVj 細胞	$-2.2 \pm 0.7$

$-6.66 \pm 2.0$ mV, そのがん化細胞であるTHEL細胞, THEL-HVJ細胞では  $-4.85 \pm 2.5$ mV,  $-2.2 \pm 0.7$  mVで、いずれもその絶対値は細胞膜静止電位より大きく、また、がん化に伴ってその減少が観察された。

IV. 細胞膜静止電位の外部イオン濃度による変化

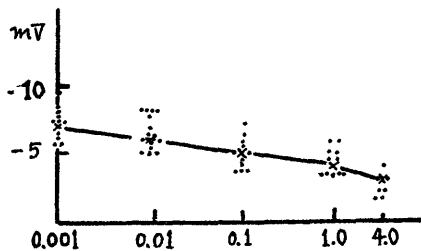
HeLa細胞では第8図の如く、外部K イオン濃度増加と共に細胞膜静止電位は減少し、明らかに外部K イオン濃度に対する依存性を示した。また、外部Na イオン濃度に対しても、第9図にみるように、Na イオン濃度が10倍に増加すると約7.0mVの割合で細胞膜静止電位は減少するが、Na イオンが高濃度になるとこの関係は失われてほぼ一定値に収れんした。

第10, 11, 12図は、L細胞とそのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞, Lost 細胞における外部K イオン濃度変化による細胞膜静止電位の態度を示したものである。図から明らかな如く、HeLa 細胞とは異なり、L細胞およびそのがん化細胞のいずれについても、その細胞膜静止電位は外部K イオン濃度変化によって著明な変化を示さなかった。

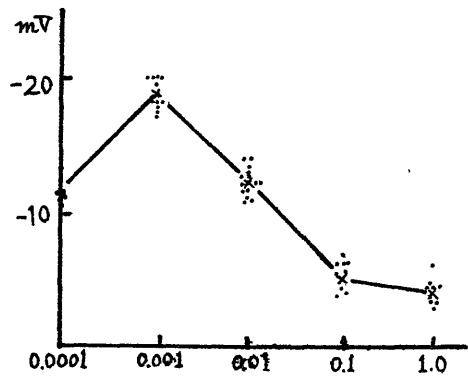
第13, 14, 15図は、同じくL細胞, LD<sub>2</sub>細胞およびLost 細胞における外部Na イオン濃度変化による細胞膜静止電位の変化を示したものである。いずれの細胞についても、その細胞膜静止電位はNa イオン濃度の増加と共に直線的に減少するが、その減少の割合はNa イオン高濃度でやゝゆるくなる傾向を認めた。L細胞ではNa イオン濃度が10倍に増加するごとに、ほぼ絶対値で10.0mV, LD<sub>2</sub>細胞では7.0mVであった。Lost 細胞ではNa イオン低濃度では10倍に増すと

第8~9図 HeLa 細胞の外部イオン濃度の変化による細胞膜静止電位の変化

第8図 HeLa 細胞 (KCl)

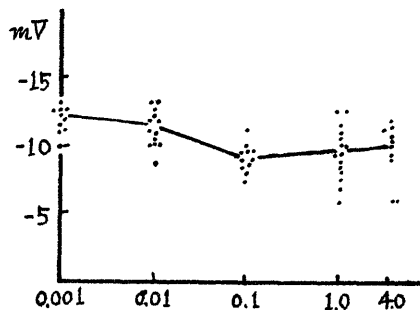


第9図 HeLa 細胞 (NaCl)

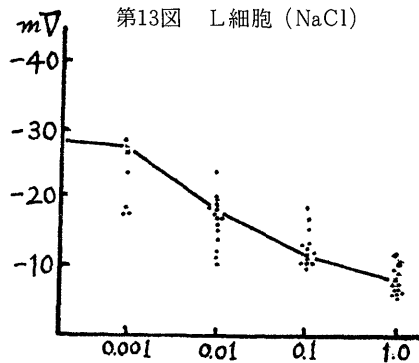


第10～15図 外部イオン濃度変化に対する細胞膜  
静止電位の変化

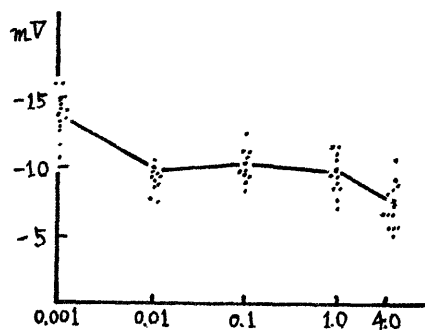
第10図 L細胞 (KCl)



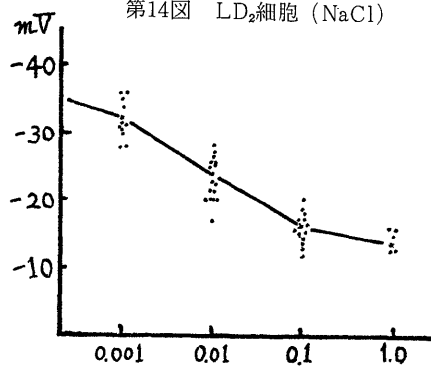
第13図 L細胞 (NaCl)



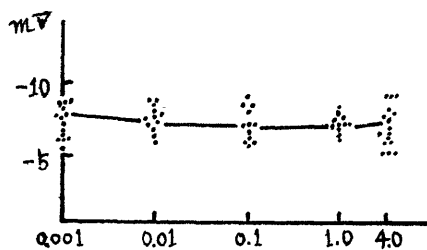
第11図 LD<sub>2</sub>細胞 (KCl)



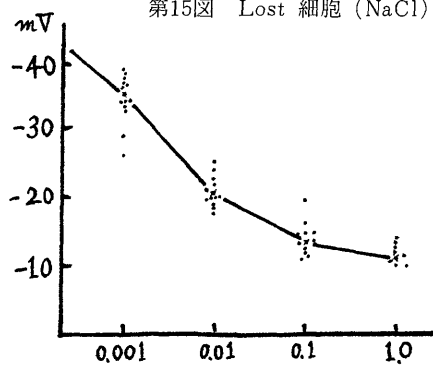
第14図 LD<sub>2</sub>細胞 (NaCl)



第12図 Lost細胞 (KCl)



第15図 Lost細胞 (NaCl)



に、10.0mVの低下であるが、Na イオン高濃度ではその低下の割合が急激に減少した。

V. 細胞膜の抵抗

次に細胞内に2本の微小電極を刺入し、外向き電流あるいは内向き電流を附加し、その電流と膜電位の変化を調べ、膜抵抗の変化を検討したのが第16図である。

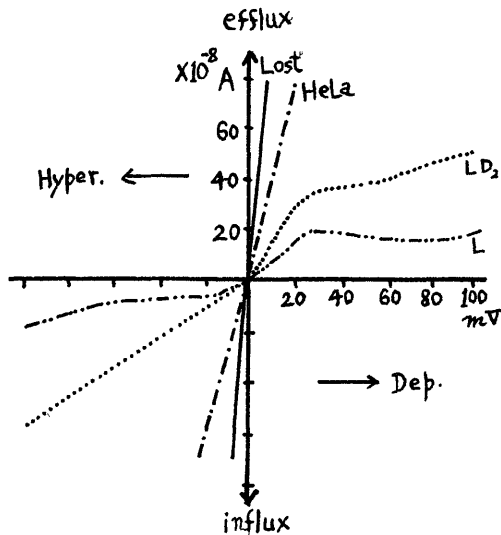
子宮頸部癌由来の HeLa 細胞では、脱分極、過分極のいずれの状態でも、膜電位に対して電流は一定の割合で変化し、 Ohm の法則に従う。

非がん化細胞であるL細胞では、脱分極あるいは過分極が低い状態で保持されると、膜電流はほぼ、Ohm の法則に従うが、さらに膜電位が上昇しても、電流は変化しないが、脱分極あるいは過分極状態が極めて高度になると電流はふたたび増加を示した。

そのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞では、一般に膜抵抗は低下し、過分極状態では Ohm の法則に従うが、脱分極では膜抵抗の低下が認められ、ほぼL細胞におけると同様の変化を示した。

同じくL細胞のがん化細胞である Lost 細胞では、HeLa 細胞と同様に、膜電位と電流の関係は Ohm の法則に従った。

第16図 電流と電圧との関係



考 察

人子宮頸部癌由来の HeLa 細胞、波多野ら<sup>13)</sup>によって継代培養に成功した人胎児肺組織由来の PHEL 細胞とそのがん化細胞である THEL 細胞、THEL-H VJ 細胞、およびマウス fibroblast 由来の L 細胞と、井上ら<sup>16)</sup>によって試験管内発がんに成功した LD<sub>2</sub> 細胞、Lost 細胞などの培養細胞を使用して、がん化に伴う細胞膜静止電位の変化を検討した。

1. 細胞膜静止電位の時間的推移

培養細胞に微小電極を刺入して細胞膜静止電位を記録する場合、時間の経過に対しての細胞膜静止電位の変化には、次の3つの型が存在する。その第1は微小電極の刺入と同時に一定の電位を示し、時間と共に変化することなくその電位を維持するA型。第2は時間と共にその電位の絶対値が増加あるいは減少するB型。第3は HeLa 細胞の外部Na イオン濃度変化の実験中にみられたように、負電位の直前に数mV～数十mVの正電位を記録し、次いで急激に負電位を示すC型である。

A型、B型の現象はマウス肝<sup>19)</sup>、脾、腎<sup>5)</sup>などの正常上皮細胞、マウス Ehrlich 腹水がん細胞<sup>3)6)12)</sup>、人胃癌細胞および正常胃細胞<sup>3)</sup>の測定などでも多数の人によって観測され、脱分極する時間経過が、がん細胞ではより急激であることが報告されており、早期の脱分極ががん細胞の特徴と考えられている。微小電極刺入による静止電位の時間的推移を検討する場合、まず刺入された微小電極による細胞膜の損傷、電極尖端からの高濃度塩化カリの漏出を考慮せねばならない。しかし同じ細胞に微小電極を2度刺入しても、同じような電位の時間的経過を示すこと、同じ電極でも、細胞の種類によってA型あるいはB型を示す場合がある。このことから、A型B型の現象は微小電極刺入による人工的な細胞障害とは考えられない。

一方森岡ら<sup>4)</sup>によると、正常胃細胞の脱分極時間は100分、胃癌細胞では80分であり Aull<sup>6)</sup>の Ehrlich 腹水がん細胞の実験では2～12分であった。培養細胞の実験では、Aull の実験結果とほぼ一致する実験結果が得られている。一般に培養細胞、浮遊細胞での脱分極時間が極めて短く、組織細胞では正常、がん細胞とも脱分極時間が長い傾向を示し、膜の機械的な刺激に対する脆弱性が重要な要素であろう。また脱分極についての正常細胞とがん細胞とにおける相違は、培養細胞を用いたこの実験では有意の差は認められなかった。

またC型の現象はその程度の差はあるが、Lashら<sup>2)</sup>

の子宮頸管内膜細胞および癌細胞の実験でも観察されている。この場合、正常細胞での陽性電位発現率は0.32%、癌細胞では55%に陰性前の陽性電位が記録されている。これらの事実を考慮すると、この陰性電位の前に出現する陽性電位は、細胞膜の静止電位とは考え難く、また HeLa 細胞で外部のNa イオン濃度を急激に変化させた過程に、特徴的に出現することなどを考慮すると、細胞表面における表層的变化による電極との接触電位を考慮すべきであろう。とにかく、がん化細胞における発現率の高さは、このことを支持すると考えられる。

## 2. がん化細胞に伴なう細胞膜静止電位の変化

人胎児肺初代培養細胞であるPHEL細胞およびその spontaneous malignant transformation を起したTHEL細胞は形態学にかなり相似点があるが、明らかに鑑別可能であり<sup>15)</sup>、また hamster 接種による oncogenicity では、PHEL細胞は non-oncogenic で、THEL細胞は strongly oncogenic であることが知られてい<sup>14)</sup>。またTHEL細胞接種による形成腫瘍は sarcoma である<sup>15)</sup>。THEL細胞にHVJを持続感染させたTHEL-HVJ細胞は、山田ら<sup>22)</sup>によると、THEL細胞に比して oncogenicity の著明の低下、cell injuring reaction の反応性の増加が確認されている。

このように、同一細胞由来の正常細胞とがん化細胞について、細胞膜静止電位は内部陰性で、がん化に伴なう絶対値の低下がみられた。ことにTHEL-HVJ細胞ではその絶対値の低下は著しかった。

マウス fibroblast 由来のL細胞での細胞膜静止電位は内部陰性で、その絶対値は人胎児肺組織由来のPHEL細胞に比して、明らかに大きな電位を認めた。そのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞、Lost細胞は、井上ら<sup>16)</sup>によると著明な oncogenicity と転移能を有し、その病理形態学的組織像は sarcoma と考えられている。L細胞に比しLD<sub>2</sub>細胞では、がん化に伴なう、むしろ僅かではあるが、細胞膜静止電位の絶対値の上昇の傾向を示し、一方 Lost細胞では殆んど変化が認められなかった。

上皮細胞である人子宮頸部癌由来の HeLa 細胞では内部陰性で、人胎児肺組織由来の非上皮性細胞およびそのがん化細胞に比して、明らかに細胞膜静止電位の絶対値が高い。悪性細胞における細胞膜静止電位は必ずしも一定の傾向を示さず、測定者によっても、また測定条件によっても、かなりの変動がみられる。例えば、マウス Ehrlich 腹水がんについての測定例では<sup>5)-8)</sup>、最高は内部陰性で $-70.4 \pm 4.1 \text{ mV}$ <sup>5)</sup>から、

内部陽性で $5 \sim 10 \text{ mV}$ まで<sup>7)</sup>かなりの広範囲な変動が見られる。また弘前肉腫細胞についての測定例<sup>23)</sup>では、Ringer 液中で93%が内部陽性電位を示し、平均 $-10 \pm 23.9 \text{ mV}$ と広範囲な分布を示すことが報告されている。

次に、がん化にともなう細胞膜静止電位の変化についてみると、人胎児肺組織由来の細胞系では、明らかに電位の絶対値の低下がみられた。しかし、マウス fibroblast 由来の細胞系では、その電位の絶対値の低下がみられなかった。正常子宮内膜細胞の細胞膜静止電位は<sup>2)</sup>、内部陰性で33mVであるのに対して、子宮頸部内膜に発生した癌細胞では内部陰性で、その値は22mVとやや小さいことが報告されており、マウス甲状腺癌、ハムスター甲状腺癌<sup>24)</sup>でも、同様の傾向がみとめられている。しかし胃癌<sup>3)</sup>では、正常細胞と癌細胞との間に大きな差はないと報告されている。

これまでに報告された測定例では、細胞の cell cycle の stage (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M期)についての考慮が不充分であるため、なお多くの問題点があるが、この実験系でみとめられたように、正常細胞では各細胞の測定値での偏位が小さく、がん化にともなう細胞膜静止電位の偏位幅が著明になること、すなわち、個々の細胞によって膜電位が異なること、上皮性細胞と非上皮性悪性細胞では、上皮性由来のがん化細胞の細胞膜静止電位が、一般に高いことなどが、大きな特徴と考えられる。がん化細胞にみられる個々の細胞膜静止電位の変動については、なお明らかでないが、THEL細胞にHVJ virus を持続感染させ、膜の modification を起したTHEL-HVJ細胞で強く細胞膜静止電位が変化することから、膜性質の変化が第一に考慮されるべきであろう。形態学的に同じ形態のがん細胞でも、その分化度に大きな相違があることと同じ原因によるものかも知れない。

## 3. がん細胞における細胞膜静止電位のイオン依存性

がん細胞の細胞膜静止電位は、興奮性細胞のそれに比して極めて小さく、またその発生母組織の正常細胞に比してもやや小さい。このことは、活動電位が必要でない非興奮性細胞では当然なのかも知れない。

上皮性由来の HeLa 細胞では、外部K<sup>+</sup>イオン濃度の増加に対して細胞膜静止電位の低下がみとめられるが、非上皮性由来のL細胞およびそのがん化細胞では著しい変化を示さない。また外部Na イオン濃度の増加に対応する細胞膜静止電位の減少は、細胞の種類によって程度の相違はあるが、HeLa細胞、L細胞およびそのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞、Lost細胞



についても一様にみとめられた。Na イオン濃度が Tyrode 液の1/1000, 1/100では、この電位の低下はほぼ直線的であるが、1/10以上では、電位の変化はほとんどみとめられない。この理由についてはなお、明らかではないが、外部Na イオン濃度が1/1000, 1/100の変化ではCl イオン濃度の変化が2.5~4.0mMの範囲であるのに対して、1/10ではCl イオン濃度は1.55mM以上になる。この点については、なお、検討を要するが、Aull<sup>6)</sup>の主張するように、Cl イオンのがん細胞膜透過性の点から考慮すべきであろう。いずれにしても、PK:PNa:PClの比は、興奮性細胞に見られる1:0.04:0.45に対して<sup>10)25)</sup>、著しく異なっていることを示す。同じような結果は、PHEL細胞およびそのがん化細胞について、山田ら<sup>22)</sup>によって観察されており、同様に Ehrlich 腹水癌についての実験から Aull<sup>6)</sup>はPNa, PCl $\gg$  PKであることを観察している。また上皮性由来のMH134腹水がん<sup>12)</sup>では、外部K'イオン濃度を0mMに減少させると、細胞膜静電位は明らかに42.0mV増加し、著しい外部K'イオン濃度依存性が観察されており、この場合PK:PNa:PClの比は異なるにしても、PK>PNaであることが確かであろう。上皮性由来の癌細胞と非上皮性由来の悪性化細胞で、このように細胞膜静電位の成因を異にすることは興味深い。

#### 4. 核膜の静電位

細胞核の静電位の測定法並びに測定された電位については、なお、多くの検討すべき問題がある<sup>19)</sup>。この実験例では、核膜静電位は、細胞膜に比して更に陰性電位を保持している。すなわち細胞膜はnegative potentialを有し、核は常に細胞質よりもnegative potentialである。この核膜静電位は核内のいずれの場所でも同じ電位を示し、ほぼ細胞膜静電位の大きさに平行した。このことは極めて興味深い。なお検討を要する。なお、ショウジョウバエの唾液腺でのKannoら<sup>19)</sup>の実験では、明らかに核膜静電位がみとめられ、イオンの拡散を十分に妨げる膜抵抗があるが、整流性や興奮性はないことが報告されており、がん化の過程におけるこの性質の検討が望まれる。

#### 5. 細胞膜抵抗

正常細胞に外向き電流、内向き電流を附加しての膜電位と膜電流の関係は、特異的である。すなわち、L細胞において電圧 $\pm 20$ mV以下では、ほぼ Ohm の法則に従うが、外向き電流、内向き電流と膜電位増加は比例しない。電圧の増加にもかかわらず電流が大きくなり、次いで電圧が高まると、ふたたび電

流が増大しはじめる。この性質は興奮性膜<sup>25)26)</sup>における程著しくはないが、膜に一種の整流作用、すなわち、膜のイオン透過に方向性のあることを示している。

L細胞に Ehrlich 腹水癌から抽出したDNAを加え、in vitro で悪性化したLD<sub>2</sub>細胞では、一般に、膜抵抗は低下するが、OriginのL細胞にみられる整流特性を保持している。しかし HeLa 細胞および組織学的に悪性度の高いマウス骨肉腫由来のDNAでがん化したLost細胞では、この整流作用は全く消失し、電圧と電流はほぼ直線的に比例する。このような結果は、小田島ら<sup>9)</sup>が指摘するように、がん化によって、膜の barrier あるいは固定電荷の異常と、それに基づきイオン分布、配列の乱れ、イオン透過の方向性が失われたことを意味する。現在この性質はがん細胞の示す生物学的特性と直接対応はできないが、がん細胞の特性消失、生体制御機構からの離脱などと関連して考察すべきであろう。

## 結 論

人癌培養細胞である HeLa 細胞、人胎児肺初代培養細胞であるPHEL細胞およびそのがん化細胞であるTHEL細胞、THEL-HVJ細胞ならびにマウス fibroblast 由来のL細胞およびそのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞、Lost細胞について、細胞膜および核膜の静電位と細胞膜抵抗の測定を行ない、癌化によりどのような変化を示すかを検討した。

1. HeLa細胞の静止膜電位は $-9.0 \pm 1.0$ mVであった。
2. L細胞の静止膜電位は $-7.4 \pm 0.26$ mVであるのに比し、そのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞、Lost細胞ではそれぞれ $-10.0 \pm 3.0$ mV,  $-7.0 \pm 3.5$ mVを示した。そのがん化による変化として絶対値の変動幅が大きいことであった。
3. PHEL細胞の静止膜電位は $-5.25 \pm 0.6$ mVであるのに比し、そのがん化細胞であるTHEL細胞では $-4.57 \pm 1.85$ mV, virus感染により膜変換をきたしたTHEL-HVJ細胞では $-1.8 \pm 0.6$ mVを示した。すなわち、がん化にともなって絶対値が減少し、その変動幅も大きいことが認められ、ことにTHEL-HVJ細胞において著しかった。

4. 核膜静電位については、HeLa細胞では $-12.8 \pm 2.4$ mVを示し、これは細胞膜の静電位に比し、絶対値が大きいこと、すなわち、核膜は細胞質よりもさらに陰性を呈することを認めた。

PHEL細胞では $-6.66 \pm 2.0$ mVであるのに比し、

そのがん化細胞であるTHEL細胞では  $-4.85 \pm 2.5$  mV, virusを感染させたTHEL-HVJ細胞では  $-2.2 \pm 0.7$  mVであった。いずれもその絶対値は、細胞膜よりも大きく、またがん化にともなってその絶対値は減少し、その変動幅が大きいことが認められた。このことから、核膜静止電位のがん化による変化は、細胞膜静止電位とほぼ同じ傾向を有することが示された。

5. 細胞外部イオン濃度の変化に対する細胞膜静止電位の変化は、HeLa細胞ではKイオンが増すとその電位は次第に減少した。Naイオンが増すとその電位はほぼ一直線に減少するが、Naイオンが高濃度になるとその減少度が少なくなり、一定値に収れんする傾向を認めた。

6. L細胞では、Kイオンの濃度の変化により細胞膜静止電位はほとんど変化を示さなかったが、Naイオンが増加すると、その電位はほぼ一直線に減少するのをみた。

7. L細胞のがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞およびLost細胞では、Kイオン濃度の変化による細胞膜静止電位の変化はほとんど認められなく、Naイオンの増加による電位の低下度はHeLa細胞ほど強くはないが、Naイオン高濃度において少くなり、一定値に収れんする傾向を認めた。

8. 細胞膜抵抗については、細胞膜に電位を附加し、脱分極と過分極との電圧-膜電流特性を調べると、次の如き結果を示した。

HeLa細胞では、脱分極、過分極いずれの状態でもOhmの法則に従う電流を認めた。すなわち、膜の整流性を失った状態を示した。

L細胞では、脱分極、過分極が低い状態で保持されると、膜電位はほぼOhmの法則に従うが、さらに膜電位が上昇しても電流は変化せず、脱分極、過分極が高度になると電流はふたたび増加した。

そのがん化細胞であるLD<sub>2</sub>細胞では、脱分極において大体L細胞に似た形をとるが、過分極においてはOhmの法則に従った電流を示した。Lost細胞では、HeLa細胞と同様、膜の整流性を失って、Ohmの法則に従った電流を示した。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師石川大刀雄教授ならびに小田島肅夫助教授に衷心より謝意を表するとともに、培養細胞を呈供していただいた本学がん研波多野基一教授、教室の井上和子博士に心から感謝致します。

## 文 献

- 1) Bernstein, J. : Arch. ges. physiol., **92**, 521 (1902).
- 2) Lash, A. F., Falk, G. & Gerard, R. W. : Am. J. Obst. & Gynec., **70**, 354 (1955).
- 3) 森岡 久 : 山口医学, **11**, 169 (1962).
- 4) 森岡 久・田中聖見・北村健二郎 : 山口医学, **15**, 268 (1966).
- 5) Tanaka, S. : Bull. Yamaguchi med. school, **12**, 21 (1965).
- 6) Aull, F. : J. cell. Physiol., **69**, 21 (1967).
- 7) Johnston, B. M. : Nature, **183**, 411 (1959).
- 8) Sekiya, T. : Gann, **53**, 41 (1962).
- 9) 小田島肅夫・種村明夫・阿部博子・石川大刀雄 : 細胞生物学シンポジウム, **21**, 285 (1970).
- 10) Hodgkin, A. L. & Katz, B. J. : J. Physiol., **108**, 37 (1949).
- 11) Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. : J. Physiol., **116**, 500 (1952).
- 12) 松井洋一郎・浅野美代子・菅野義信 : 広島大医誌, **16**, 752 (1968).
- 13) 波多野基一・清水隆作・森田修行・山岸高由 : 医学と生物学, **74**, 293 (1967).
- 14) 矢吹朗彦 : 金大がん研年報, **2**, 113 (1968).
- 15) 渡辺駿七郎 : 金大がん研年報, **3**, 163 (1970).
- 16) 井上和子・河野尚子・小西三三男・石川大刀雄 : 細胞生物学シンポジウム, **21** (1970).
- 17) 高瀬武平・真鍋 昌 : 整形外科, **15**, 1 (1964).
- 18) 中井準之助編 : 組織培養—基礎と応用, 78頁. 東京, 朝倉書店, 1964.
- 19) Kanno, Y. & Loewenstein, W. R. : Nature, **31**, 149 (1963).
- 20) Kanno, Y. & Matsui, Y. : Nature, **218**, 775 (1968).
- 21) 菅野義信 : 日生理誌, **30**, 49 (1968).
- 22) 山田 燦・田中淳之・清水隆作・波多野基一・小田島肅夫 : 細胞生理学シンポジウム, **21**, 339 (1970).
- 23) 中村 勉・鳴海引憲 : 日生理誌, **29**, 399 (1967).
- 24) Jamakosmanovic, A. & Loewenstein, W. R. : Nature, **218**, 775 (1968).
- 25) Fishman, H. M. & Macey, R. I. : Biophysical J., **9**, 151 (1969).
- 26) Goldman, D. E. : J. gen. Physiol., **27**, 37 (1943).

## Abstract

Following cultured cells were used in the experiments reported in this paper : carcinoma cell of the human cervix (HeLa), primary normal human embryonic lung cell (PHEL), its malignant transformed cell (THEL), HVJ virus carrier cell of THEL (THEL-HVJ), mouse fibroblastic cell (L), Ehrlich ascites cell DNA transformed L cell (LD<sub>2</sub>), and osteosarcoma DNA transformed L cell (Lost). To investigate the differences of surface membranes of these cells, the resting potential and the resistance of cell membranes were measured and compared with those of HeLa cell taken as standards.

1. The resting potential for cell membranes of PHEL-system cells were smaller than those of L-system cells. In general, the variation of resting potential of cell membranes was increased in the malignancy of the cell.

The absolute values were increased in L-system cells and decreased in PHEL-system cells. Especially, the remarkable decrease in the values was observed in THEL-HVJ cells.

2. The absolute value of the resting potential of nucleus in PHEL-system cells was larger than that of cell membranes and decreased in the malignancy of the cell. These observations on the cell nucleus were the same as those on the cell membranes.

3. When the concentration of extracellular potassium ions was increased, the value of resting potential of membrane in HeLa cell was decreased, however the values in L-system cells remained relatively constant. On the contrary, when the concentration of extracellular sodium ions was increased, the absolute value of resting potential of membrane was decreased. The average value of decrease was 7~10mv for each tenfold change in concentration. However, the slope was gentle in HeLa cell and Lost cell in higher concentration.

4. When the cell had a microelectrode inserted was loaded with rectangular wave voltage, a hyperpolarization or depolarization was observed. The change of electric current in L cell and LD<sub>2</sub> cell was analogous to the junction with N-type semi-conductor in the electrical engineering. The resistance in LD<sub>2</sub> cell was smaller than that in L cell. The resistance in Lost cell and HeLa cell was greater and the intensity of electric current obeyed the ohmic law.

The biological meaning of this change was not clear, but the disappearance of polarity and the secession from regulation system in malignant cells were considered to be linked with the characteristics of cell membranes.