

# 癌のエネルギー代謝

とくにミトコンドリアの電子伝達系及び酸化的リン酸化系を中心として

金沢大学大学院医学研究科外科学第二講座(主 任 水上哲次教授)

金沢大学大学院医学研究科病理学第二講座(研究主任 石川大刀雄教授)

広 瀬 道 郎

(昭和43年1月17日受付)

癌細胞のエネルギー代謝は、主に解糖と呼吸の相関々係について研究されている。即ち Crabtree<sup>1)</sup> による“糖添加による呼吸活性の減少”—Crabtree 効果—に端を発し、Warburg<sup>2)</sup> らは、多くの実験事実から癌組織の強大な成長に必要なエネルギーの供給源は、呼吸よりむしろ解糖作用にある<sup>2)</sup> と考え、更に進んで発癌は、組織における持続的呼吸障害による結果であろうとしている<sup>3)~5)</sup>。しかし癌の特異性として強調される Crabtree 効果も“maximum deviation tumor”では例外なく認められる<sup>6)</sup>が、Morris の“minimum deviation tumor”では確認されていない<sup>6)</sup>。また、最近の癌の生化学的研究では、癌組織の酵素活性の変動が著しいことが報告されているが、何れも癌の特異性としての決定的要因となるものはなく、むしろ癌細胞自体におけるエネルギー代謝調節機構の乱れと考えるべき点が多い。このような立場で考えると、癌のミトコンドリアの性格についての検討が重要となってくる。

最近になってミトコンドリアの分画法が進歩し、“intact”、“coupled”のミトコンドリアの採取が可能となり、腹水癌細胞からの採取法も確立し、その機能の研究が、容易かつ活潑となっている。私共の研究室でも、ここ数年来、癌ミトコンドリアの機能<sup>7)</sup>に注目し、その免疫学的解析<sup>8)~10)</sup>と併行して検討しているが、著者は更に進んでDAB色素飼育による癌化の過程を中心に、それと起源を同じくする各種腹水癌(AH127, AH130, AH66F)及び系を異にする吉田肉腫腹水癌のミトコンドリアについて、電子伝達系、酸化的リン酸化系、これらに同期する膨化収縮について検討した。加うるにリン酸化系に関与する Pi の取り込み、Pi-ATP 交換反応、ATPase 等の生化学的

機能をも測定し、共同研究者である久藤<sup>11)</sup>の行なった物性的解析、高沢<sup>12)</sup>の膜リン脂質の研究と対照し総合的な検討を試みた。

## 実験材料及び実験方法

### I. 使用動物ならびに材料

DAB 肝癌の作製法は原田・水谷法<sup>13)</sup>に準じた。即ち、3'メチル・4ジメチアミノアゾベンゼン(以下DABと略す)をオリーブ油にとかし、終濃度が0.06%となるように屑米と混合したものを飼料として、体重約150grのWistar系ラットに与え、それ以外は水のみを充分与えるようにした。この方法によると、飼育後約6カ月で肝癌が発生する。ミトコンドリアの分離に際しては、できるだけ壊死部分及び肝硬変部をとり除き、癌結節部分のみを材料として使用するようにした。また癌化の過程を検討するために、飼育後1カ月目より5カ月目(完全に肝硬変を形成)までの各月の肝組織をも材料とした。

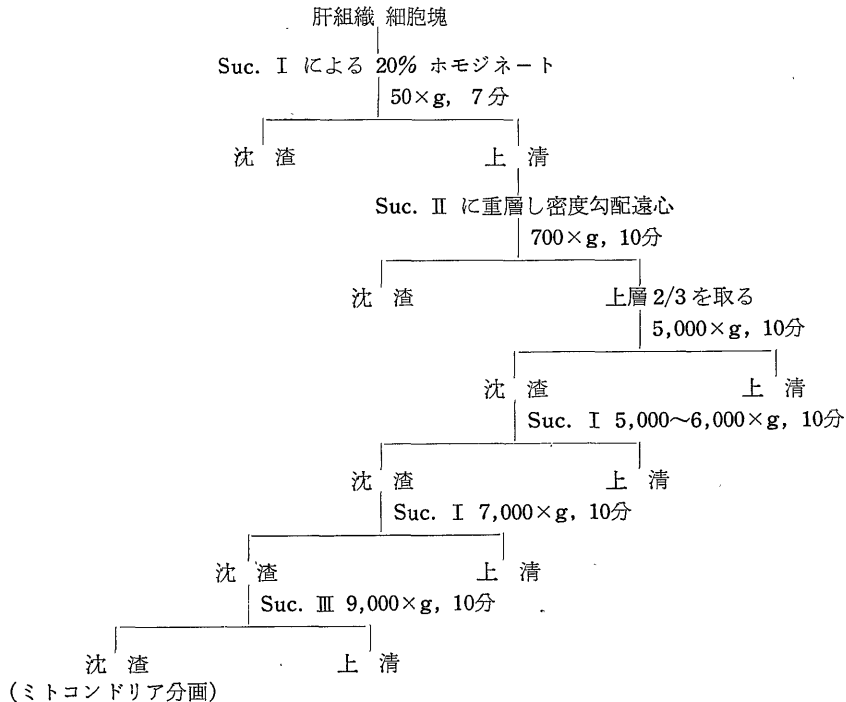
AH127, AH130, AH66F, 吉田肉腫等の腹水癌は、佐々木研より分与されたものを用いた。各種癌の移植には、雑系ラット(但し、AH66Fのみ呑電系ラット)を使用し、AH127は移植後2週間目、その他は1週間目の腹水癌細胞を使用した。

### II. ミトコンドリア分離法

ミトコンドリアの分離は、Hogeboom-Schneiderの変法<sup>14)</sup>により表1に従って行なった。即ち、ラットを無麻酔下で斬首、瀉血しすばやく肝臓を剔出した。氷冷下で(以下すべての操作は、0°~4°Cでできる限り迅速に行なった)肝臓を、3~5mm<sup>3</sup>の細片とし、蔗糖液I(0.25M蔗糖, 0.01~0.02M Tris-buffer, 0.1mM EDTA, pH7.4)に浮遊させ、血球成分をで

The Energy Metabolism of Cancer with Special Reference to Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation of Mitochondria. Michio Hirose, Department of Surgery (II) (Director: Prof. T. Mizukami), Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

表1 ミトコンドリア分画法



きるだけ取り除くために溶液を数度変えて洗滌した。ついで、4倍量の蔗糖液Iを加え、Potter-Elvehjem型ガラス・ホモジナイザー、さらにテフロン・ホモジナイザーを用いて、組織細片を20%ホモジネートとした。つぎに50×g, 7分遠心して核成分を落とし、その上清を蔗糖液II (0.34M 蔗糖, 0.05M Tris-buffer, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) に重層し、700×g, 10分遠心して粗大夾雑物を除いた。この上清2/3をさらに5,000×g, 10分遠心して、比較的顆粒の大きいミトコンドリア分画を得た。さらにこのミトコンドリア分画を、蔗糖液Iに溶かし、6,000×g, 10分続いて、7,000×g, 10分遠心洗滌した。最後にその沈渣を蔗糖液III (0.25M 蔗糖, 0.01M Tris-buffer, pH 7.4) に溶かし9,000×g, 10分遠心し沈澱したミトコンドリア分画を用いた。

このミトコンドリアを、蔗糖液IIIにて100 mg wet weight/ml の割合で溶かして懸濁液を作成した。この値は、ミトコンドリア蛋白量にして約10 mg/mlに相当する。調製したミトコンドリアは、できるだけ敏速に実験に供し、すべての実験は同一のミトコンドリアを使うようにした。各種腹水癌細胞の場合は、小林・萩原<sup>15)</sup>の方法に従って、採取した細胞を遠心洗滌(2回)し、約20倍量の細胞浮遊液を作り、以下上記と同様の操作でミトコンドリアを分離した。

なお Scholefield, Sato, Weinhouse<sup>16)</sup> に準じた Utsumi<sup>17)</sup> の方法による腹水癌細胞からのミトコンドリア分離法を検討し、また細胞調製液にATPを添加する試みも行なった。これら採取されたミトコンドリアは、電顕像により、その構造がよく保たれていることを確認した。

### III. オキシメータ及び90°光散乱装置

ミトコンドリアの酸素消費量を定量するため、反応液中に溶存する酸素張力の変化を記録する酸素電極(オキシメーター)、このときの膨化収縮等の容積変化を測定するための90°光散乱装置は、Packer<sup>18)</sup>の方法に準じた清水<sup>19)</sup>の装置を使用した(図1)。

#### 1. オキシメーター(酸素電極法)

酸素電極法は、Chance<sup>20)</sup>、萩原<sup>21)</sup>氏考案による半閉鎖式回転白金電極法に従った。ただし、陽性にはカロメル電極の代りに銀-塩化銀電極を使用した。反応容器は、図2に示すように、石英ガラス、プラスチック、銀板より作られている。銀板上に塩化銀メッキをほどこし、更にその上面を10%KCl寒天板でおおった。反応容器の容積は、白金電極挿入後正確に2.0mlになるようにした。この反応容器に回転白金電極を挿入し、電解電圧は-0.7Vとした。反応容器の温度は、恒温槽によって25°Cに保つようにし、記録計はQPD 53型日立卓上記録計を用いた。なお standard

medium としては、0.05 M 蔗糖, 0.02 M KCl, 0.01 M Tris-buffer, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM  $MgCl_2$ , pH 7.4 を使用した。

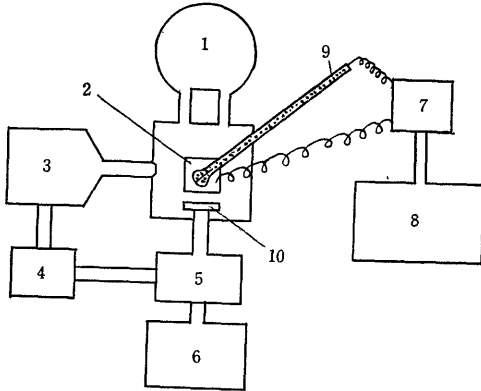
この装置は、電氣的に安定で、外部からの酸素侵入の心配がなく、また  $-0.4V$  から  $-0.9V$  までの電圧を加えたとき、陰極反応電流は一定値を示す。従ってこの間の電圧であれば流れる電流量は、溶存する酸

素量に比例すると考えてよい。

2. 90° 光散乱装置

90° 光散乱装置は、Shimazu photoelectric light-scattering photometer No. 5937 を使用し、図1のように、オキシメーターに組み入れた。650 m $\mu$  の光線を反応容器に導き、入射光に対して 90° 方向に 650 m $\mu$  のフィルター、光電管を置き、散乱光の変化のみを増幅し、連続的に記録するようにした。

図1 装置の略図



1. 恒温槽
2. 反応容器
3. Hg ランプ源
4. 供給電源
5. D. C アンプ
6. 記録計 (1)
7. オキシメーター
8. 記録計 (2)
9. Pt 電極
10. 650 m $\mu$  フィルター

IV. 呼吸酵素活性測定法

測定は Davis<sup>22)</sup> らの方法に従って下記のように行ない、吸光度は顕微分光光度計 (オリンパス M.S.P. -AIV) に記録計を接続し、その変化を連続的に記録した。なお反応はすべて 25°C で行なった。

1. NADH oxidase 活性

まず 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.6 を 1 ml のキューベットに入れ、ついで 0.1 ml の  $3 \times 10^{-3} M$  NADH をピペットですばやく吹き込み、更に 0.2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液を入れ、直ちに 340 m $\mu$  における吸光度を測定した。

2. NADH cytochrome C reductase 活性及び succinate cytochrome C reductase 活性

0.045 M リン酸緩衝液 pH 7.6,  $1 \times 10^{-3} M$  KCN,  $2.6 \times 10^{-5} M$  cytochrome C,  $1.0 \times 10^{-4} M$  NADH または  $1.7 \times 10^{-2} M$  コハク酸ソーダの混合液 1 ml に、0.2 mg Protein 量のミトコンドリア懸濁液を吹き込み、550 m $\mu$  における吸光度を測定した。

3. NADH dehydrogenase 活性

0.048 M リン酸緩衝液 pH 7.6,  $1 \times 10^{-3} M$  KCN,  $1 \times 10^{-4} M$  NADH に電子受容体として  $3.3 \times 10^{-4} M$   $K_3Fe(CN)_6$  を加えたもの 1 ml に、0.2 mg protein 量のミトコンドリアを加え、直ちに 340 m $\mu$  における吸光度を測定した。

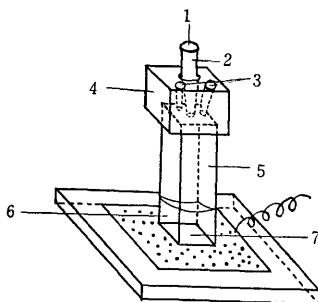
4. Succinic dehydrogenase 活性

0.045 M リン酸緩衝液 pH 7.6,  $1 \times 10^{-2} M$  KCN,  $1.3 \times 10^{-3} M$  コハク酸ソーダ,  $1.0 \times 10^{-3} M$   $K_3Fe(CN)_6$  混合液 1 ml を、standard medium とし、0.2 mg protein 量のミトコンドリアを吹き込み、400 m $\mu$  における吸光度を測定した。

5. Cytochrome C oxidase 活性

奥貫<sup>23)</sup>の方法を改良してつぎのように行なった。即ち 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.1 14.5 ml, 0.1 M セミカルバジド塩酸溶液 pH 7.1 (NaOH で pH 調整) 3 ml, 0.4% cytochrome C 水溶液 2.5 ml, この混合液に、蒸留水 10 ml を加え、合計 30 ml とする。この混合液 2 ml をオキシメーター附属の反応容器に入れ、更に 1.2% ヒドロキノン液 200  $\mu$ l を加え、

図2 反応容器



1. Pt 電極挿入部
2. ゴムキャップ
3. 物質添加口
4. プラスチック板
5. 石英ガラス槽
6. 10% KCl agar
7. 銀・塩化銀電極

これに 2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液を吹き込みオキシメーターで酸素消費を記録した。

#### V. Pi-ATP 交換反応

測定は Chen-Dallan<sup>24)</sup> の方法に従った。即ち

1. 4.0  $\mu$  moles  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 4.0  $\mu$  moles ATP, 1.0  $\mu$  moles  $KH_2PO_4$ , 5.55  $\mu$  moles Tris-buffer pH 7.5, 8.3  $\mu$  moles KCl を含む 0.3 ml の混合液に 2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液を入れ, 更に Carrier として 0.01 M リン酸緩衝液を使用した  $^{32}P$ i 溶液 (pH 7.5) を 10  $\mu$ c/ml 加え, 30°C, 2 分 incubate する。

2. この 1 ml にあらかじめ作製して氷冷しておいた試薬 A (0.05 M  $Na_2SO_4$  を含む 10% 過塩素酸液, 使用直前に 1~2 滴のプロム液を落す) 液 1 ml を加え, 更に試薬 B (4% モリブデン酸塩液 50 ml, メタノール 40 ml, ヘキサノール 1.2 ml に, 蒸留水を加え全体を 100 ml にしたもの, 使用直前に調製) 液 2 ml を添加する。

3. この混合液を Hagihara, Lardy<sup>25)</sup> の方法によりシリコン化した celite カラムにかけ, 氷室中にて over night する。

4. つぎに, 分離された ATP<sup>32</sup> 液の放射能指数を測定した。測定には Well type scintillation counter (東芝 Model EAG-31103) を用いた。なお, 添加する ADP, DNP の濃度は, それぞれ 100  $\mu$ M 10  $\mu$ M である。

#### VI. $^{32}P$ i の取り込み

Hagihara, Lardy<sup>25)</sup> らの方法にヒントを得て, つぎのとおりに行なった。即ち, standard medium に 2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液を加え, succinate 3 mM, ADP 100  $\mu$ M, DNP 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M を順次加え, オキシメーターで酸素消費曲線を描かせながら, それぞれの試薬添加後に 0.5 ml を取り出し, 前項の Pi-ATP 交換反応で使用した試薬 A 液 1 ml, 試薬 B 液 1.5 ml を加え, 以下同様の操作で放射能指数を測定した。

#### VII. ATPase 活性

測定は Chen-Dallan<sup>24)</sup> の方法により, 下記の順序で行なった。

1. 5.0  $\mu$  moles ATP, 5.0  $\mu$  moles Tris-buffer, 12.0  $\mu$  moles KCl, pH 7.5 を含む 0.3 ml の液に 2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液を加え, 30°C, 4 分 incubate する。

2. 10% 過塩素酸液 1 ml を加え, 反応を停止させ 1,500~2,000 rpm 5 分遠心する。

3. この上清 1 ml を, 15 ml 画線付 共栓試験管

にとり適当量の蒸留水にてうすめる。

4. この液の無機磷を King<sup>26)</sup> の変法により定量し, あらかじめ作っておいた無機磷の標準曲線より, Pi 量を求めた。

即ち上記の液に, 1.2 ml の 60% 過塩素酸液, 1 ml の 50% モリブデン酸塩液, 0.5 ml の 0.2% アミノ・ナフトールスルホン酸液をこの順序で加え, 加える毎に軽く振盪する。更に蒸留水を加え, 全体を 15 ml とし室温 20°C に 5 分間放置し, Pi を含まない試薬のみをブランクにとり, 660 m $\mu$  における吸光度を, HITACHI Perkinelmer 193 UV-Vis spectrophotometer を使って測定した。なお, 添加する賦活剤の濃度は, それぞれ DNP 1 $\times$ 10<sup>-5</sup>M, Mg<sup>++</sup> 6 $\times$ 10<sup>-3</sup>M, Ca<sup>++</sup> 10 $\times$ 10<sup>-3</sup>M である。

#### VIII. 電子顕微鏡的検査

2% オスミウム酸緩衝液に酢酸ペロナル緩衝液を 2:1 に混じたもの<sup>27)</sup> で 30 分固定し, エタノール 50, 70, 90, 100% の段階列で各 10 分, 最後にアセトンで 10 分脱水後, エポン・包埋<sup>28)</sup> を行ない, ウラニール及び鉛の二重染色をほどこし, 日立 Hu-9 型電子顕微鏡で観察した。

### 実験結果

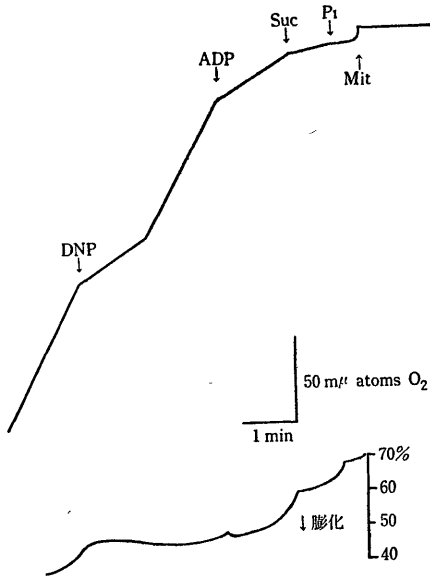
#### I. オキシメーター及び 90° 光散乱装置による検査

##### 1. 正常ラット肝ミトコンドリア

##### 1) 酸素消費量, ADP/O 比, 呼吸調節率

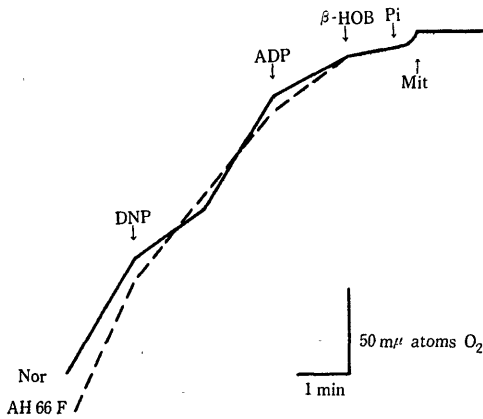
前述のオキシメーター附属の反応容器を, 反応液 (standard medium) で充分洗滌した後, 反応液 2 ml を入れ, -0.7 V の電解電圧を加える。この場合の電流量は酸素量に比例する。即ち 25°C で反応液 1 ml 中に含まれり酸素量を 480 m $\mu$  atoms として, 電流値より酸素量への換算が可能となる。電極の安定を待って, 2 mg protein 量のミトコンドリア懸濁液 (即ち, 反応液 1 ml に対して 1 mg protein) を添加する。図 3-a に示すように, 先ず温度変化, ミトコンドリア懸濁液の無酸素状態のために反応液中の酸素濃度が急激に低下し, 続いて固在基質による内部呼吸が行なわれる (Chance<sup>29)</sup> のいう state 1)。更に 3 mM の Pi (pH 7.4) を加える。このときの内部呼吸 (state 2) による酸素消費量は平均 5.6 m $\mu$  atoms/ml (1 mg protein 量のミトコンドリアに相当) である。つぎに基質として 3 mM の succinate を加えると, 呼吸が増大して state 4 の状態となる。このときの酸素消費量は平均 18.9 m $\mu$  atoms/min/ml である。更に ADP 100 m $\mu$  moles を添加すると, 呼吸は, state 4 から state 3 の状態にうつり, 急激に酸素消

図3-a 正常ラット肝ミトコンドリアの酸素消費曲線(上段)及び90°光散乱度曲線(下段)



Mit : ミトコンドリア懸濁液 2mg protein 量添加  
 Pi : 3mM pH 7.4 添加  
 Suc : succinate 3mM 添加  
 ADP : 100 mμ moles 添加  
 DNP : 10 μM 添加

図3-b β-Hydroxybutyrate を基質に用いた場合の正常ラット肝及び AH66F ミトコンドリアの酸素消費曲線並びに各値



実験群	ADP/O	酸素消費量 mμ atoms /min	呼吸調節率
Nor Mit	2.6	16.1	3
AH66F Mit	—	20.2	1.9

費が増大する。加えた ADP 全量がリン酸化され、ATP になると再び state 4 に戻る。即ち正常ミトコンドリアでは、ADP による呼吸調節能が充分よく保持されている。この間の酸素消費量は、平均 45.4 mμ atoms/ml であり、ADP/O 比は 100 mμ moles/45.4 mμ atoms=2.2 となる。state 3/state 4 で示される呼吸調節率<sup>30)</sup>は 3.70~4.20 である。ついで脱共扼剤 (uncoupler) である DNP 10 μM を添加すると、酸化的リン酸化は uncoupling し、呼吸解放 (respiratory release) が起り、このときの酸素消費量は 61.1 mμ atoms/min/ml である。基質に β-Hydroxybutyrate を用いた場合は、state 4 の酸素消費量は 16.1 mμ atoms/min/ml、ADP/O 比は 2.6、呼吸調節率は 3、DNP による呼吸解放時の酸素消費量は 50.6 mμ atoms/min/ml である (図 3-b)。

2) 90° 光散乱度

図 3-a に示す如く、state 1 の状態でのミトコンドリア懸濁液 (2mg protein 量) の光散乱度を 70% とし、これを基準としてその増減を % で表示した。なおこれらの光散乱度は、すべてオキシメーターと同時に測定した。光散乱度は、Pi を加えると減少し (ミトコンドリアは膨化する<sup>18)31)32)</sup>、succinate を加えると、更に減少は著明になる。ADP の添加では、光散乱度の減少はおさえられて、増加を示す (ミトコンドリアは収縮する<sup>33)</sup>)。DNP を添加すると再び光散乱度の減少がみられる。

2. DAB 飼育各月及び DAB 肝癌ミトコンドリア

1) 酸素消費曲線は、図 4 に示すように succinate による state 4 の酸素消費量は、DAB 飼育 4 カ月目までは、正常と大差なく 18.5 mμ atoms/min/ml 前後を示すが、顕著な肝硬変を形成する 5 カ月目では、19.9 mμ atoms/ml と増大する。ADP/O 比は、飼育の経過に応じて次第に低下し、5 カ月目では 1.6 となる。同じように呼吸調節率も次第に低下し、5 カ月目のミトコンドリアでは、1.9 に減少する。DAB 肝癌では、state 4 の酸素消費量はむしろ増大し 28.7 mμ atoms/min/ml であるが、ADP による呼吸調節能が完全に失われる (表 2)。

2) 90° 光散乱度では、飼育の経過と共に膨化収縮能の低下を示す。Pi 及び succinate 添加時の膨化の度合は、正常に比し、飼育後 2 カ月目のミトコンドリアでは 90%、5 カ月目では 75%、DAB 肝癌では、約 50% となる (図 4)。

3. 各種腹水癌細胞ミトコンドリア

1) 酸素消費量についてみると、state 4 による呼

吸は、いずれの腹水癌でも増加するが、特に AH66F では、 $33.8 \text{ m}\mu \text{ atoms/min/ml}$  で正常の約1.9倍である。ADP による呼吸調節能も共通して失われ、呼吸調節率は1.8前後を示す。また DNP による脱共軛作用も顕著でなく、約  $50 \text{ m}\mu \text{ atoms/min/ml}$  の酸素消費が認められ、各種腹水癌相互の間には、大差はない(図5, 表3)。この結果は、ミトコンドリア及び、succinate, ADP 等の量を変え、またこれらを種々

図4 DAB 飼育後2カ月, 5カ月及び DAB 肝癌各ミトコンドリアの酸素消費量曲線(上段)並びに  $90^\circ$  光散乱度曲線(下段)

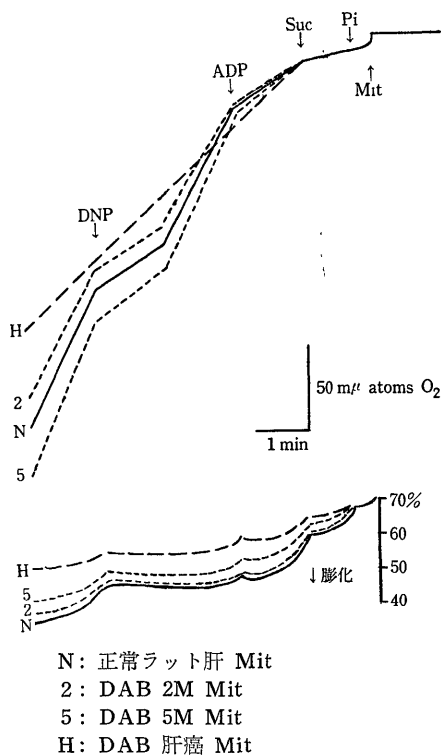


表2 正常ラット肝及び DAB 飼育各月, DAB 肝癌, 各ミトコンドリアの ADP/O 比, 酸素消費量, 呼吸調節率

実験群	ADP/O	酸素消費量 $\text{m}\mu \text{ atoms/min}$	呼吸調節率
Nor. Mit	2.2	18.9	3.7
DAB 1M	2.2	18.7	2.8
DAB 2M	2.0	18.6	2.4
DAB 3M	2.1	18.8	2.2
DAB 4M	1.8	19.0	2.2
DAB 5M	1.6	19.5	1.9
DAB 肝癌	—	28.7	—

に組み合わせて実験しても同様である。

なお、基質に、 $\beta$ -Hydroxybutyrate を用いた場合は、AH66F 1例をとると succinate 基質に比べ、state 4 の酸素消費は、むしろ低下するがその他の点では、殆んど succinate を基質に用いた場合と大差がない(図3-b)。

2)  $90^\circ$  光散乱度については、Pi 及び succinate による光散乱度の減少(膨化度)は低下し、正常に比べ約75%から50%となる。ADP による収縮はみられず、DNP による膨化度も約50%に減弱する(図5)。

## II. 呼吸酵素活性

正常肝ミトコンドリアの各種呼吸酵素活性は、図6の如くで、横軸は反応時間(分)、縦軸は基質の消費

図5 各種腹水癌細胞ミトコンドリアの酸素消費曲線(上段)及び  $90^\circ$  光散乱度曲線(下段)

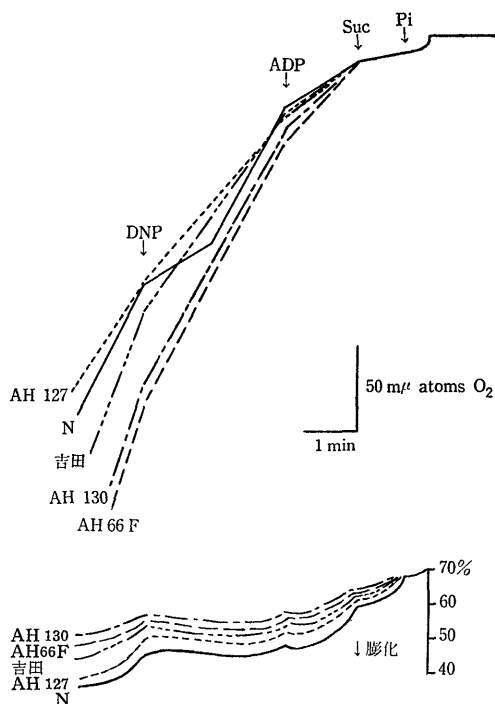


表3 正常ラット肝及び各腹水癌細胞ミトコンドリアの ADP/O, 酸素消費量, 呼吸調節率

実験群	ADP/O	酸素消費量 $\text{m}\mu \text{ atoms/min}$	呼吸調節率
Nor. Mit	2.2	18.9	3.7
AH 127 Mit	—	22.1	1.7
AH 130 Mit	—	29.6	1.9
AH 66F Mit	—	33.8	1.7
吉田肉腫 Mit	—	22.8	1.8

量 (0 time を100とする) を示している。DAB 飼育 5 ヵ月目のミトコンドリアでは、いずれの酵素活性も正常の 1/2 程度、DAB 肝癌では約 1/7 に減少している (図 7-a, b, c, d, e)。

各種腹水癌ミトコンドリアにおいても、すべての酵素活性は低下し、その度合は AH127 が最も顕著で、ついで吉田肉腫、AH130, AH66F の順である (図 8-a, b, c, d, e)。

なお、cytochrome C oxidase 活性は、正常に比べて、DAB 肝癌, AH127, AH130, AH66F, の順に低く、DAB 肝癌では、正常の 99.8 μ atoms O<sub>2</sub>/min に比べて、約 1/4 の 27.4 μ atoms O<sub>2</sub>/min の

図 6 正常ラット肝ミトコンドリアの各酵素活性  
横軸は時間 (分), 縦軸は 0 time を 100 とした基質の消費量を表わす。

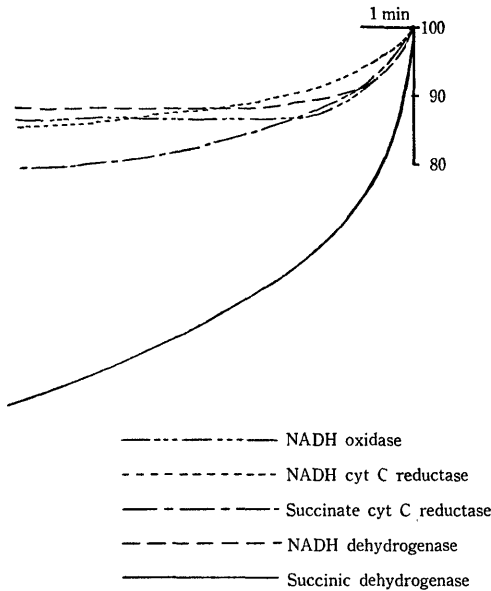
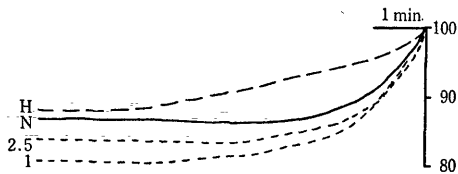


図 7-a DAB 飼育後 1 ヵ月, 2 ヵ月, 5 ヵ月 及び DAB 肝癌, 各ミトコンドリアの NADH oxidase 活性



N: 正常ラット肝 Mit  
1: DAB 1M Mit  
2: DAB 2M Mit  
5: DAB 5M Mit  
H: DAB 肝癌 Mit

値を示す (図 9)。

III. Pi-ATP 交換反応

先ずシリコン化した celite カラムが、遊離の Pi を充分分離吸着し得るかどうかを検討するため、数度の基礎実験を行なった。即ち、表 4 に示すように、ミトコンドリアに Carrier-<sup>32</sup>Pi のみを添加した場合の放射能指数は 758 c.p.m であるが、ATP 液を加えると、Pi-ATP 交換反応の結果、ATP<sup>32</sup>が増加し 45001 c.p.m と非常に高い放射能指数を示す。しかも

図 7-b 同 NADH cyt. C reductase 活性

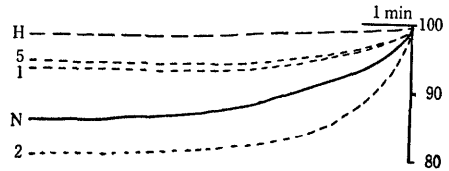


図 7-c 同 Succinate cyt. C reductase 活性

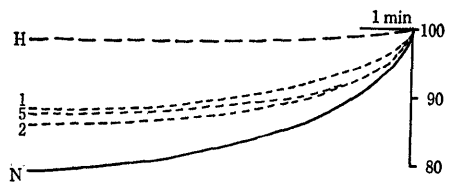


図 7-d 同 NADH dehydrogenase 活性

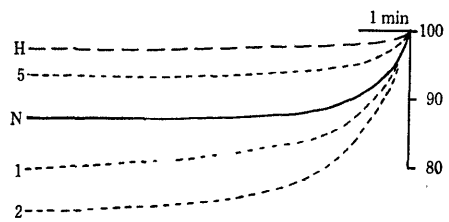


図 7-e 同 Succinic dehydrogenase 活性

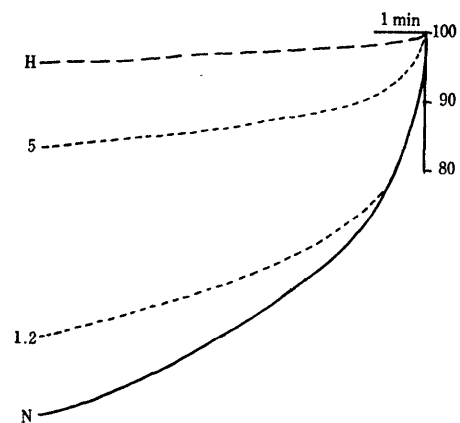


図8-a 各種腹水癌細胞ミトコンドリア NADH oxidase 活性

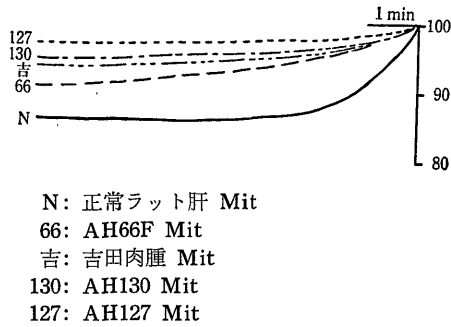


図8-b 同 NADH cyt. C reductase 活性

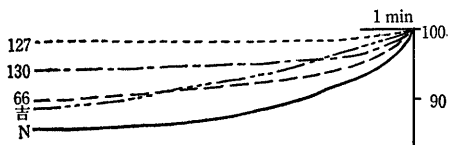


図8-c 同 Succinate cyt. C reductase 活性

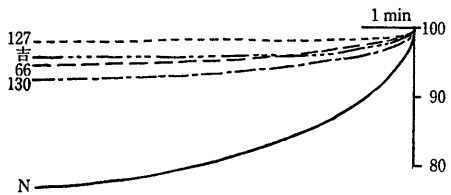


図8-d 同 NADH dehydrogenase 活性

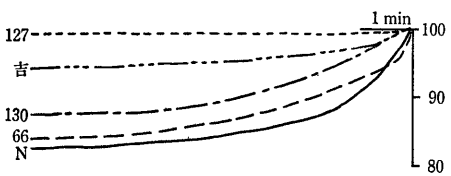


図8-e 同 Succinic dehydrogenase 活性

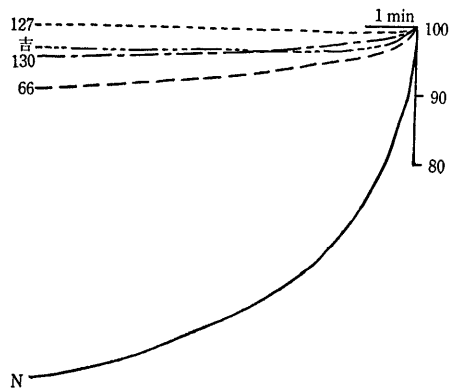
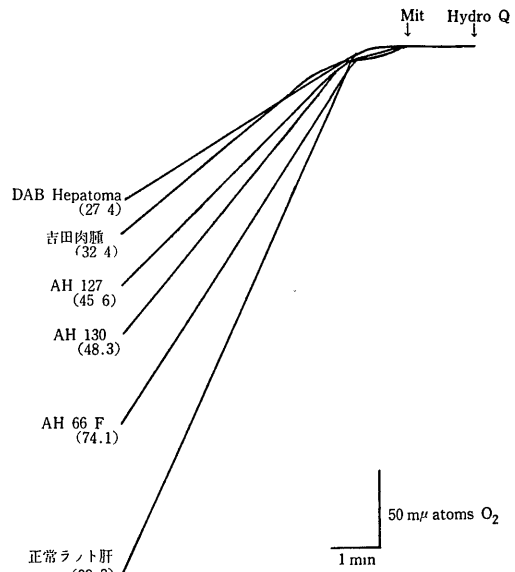


図9 各ミトコンドリア cytochrome C oxidase 活性



( ) 内は  $m\mu$  atoms  $O_2/min$  を表わす。

この ATP<sup>32</sup> の指数は、ミトコンドリア、ATP 液の量に応じて増加する。この成績より我々の用いたカラムは、充分 Pi を吸着除去することが確かめられた。

1. 正常ラット肝ミトコンドリア

交換反応は、非常に活発で高い放射能指数を示す。ADP 100  $\mu$ M により 58.7%, DNP 10  $\mu$ M により 74.1% の阻害を受け、交換反応が ATP 合成系に密接に関連していることを実証している (表 5)。

2. DAB 飼育各月及び DAB 肝癌シトコンドリア

飼育後 3 カ月目までは著変はないが、4 カ月目、5 カ月目では、正常に比べて、それぞれ 81.6%, 78.1% を示す。ADP, DNP の阻害効果も飼育 3 カ月目までは変化が認められないが、4 カ月目では、それぞれ 50.1%, 65.8%, 5 カ月目では 49%, 60.3% と次第に低下の傾向を示す。DAB 肝癌では、交換反応は正常の 14% に減弱し、ADP, DNP による阻害率もそれぞれ 46.6%, 58.1% に低下する (表 5)。

3. 各種腹水癌細胞ミトコンドリア

各種腹水癌ともに、交換反応は著しく阻害され、正常の 3%~15% 程度を示す。これに対応して ADP は 20% 前後、DNP は最高 64% と低い阻害効果しか表わさない (表 6)。

VI. <sup>32</sup>Pi の取り込み

先ず表 7 に示す如き基礎実験を繰り返した。



表4 Pi-ATP 交換反応に関する基礎実験成績

実験群	<sup>32</sup> Pカウント数 (c.p.m)
1) Carrier + ATP 液 + Mit (2mg Protein)	34
2) Carrier - <sup>32</sup> Pi (10 μc/ml) + Mit (2mg Protein)	758
3) Carrier - <sup>32</sup> Pi (10 μc/ml) + ATP 液 + Mit (2mg Protein)	45001
4) 3) + Mit (2mg Protein)	81793
5) 3) + Mit (4mg Protein)	120371
6) Carrier - <sup>32</sup> Pi (20 μc/ml) + ATP 液 + Mit (2mg Protein)	46372
7) 6) + ATP 液 (0.3 ml)	79431
8) 6) + ATP (0.3 ml) + Mit (4mg Protein)	277352

表5 正常ラット肝及びDAB飼育各月, DAB 肝癌, 各ミトコンドリアのPi-ATP 交換反応

動物及び処置群	<sup>32</sup> P カウント数 (c.p.m)	阻害率 (%)
Nor. Mit.	45001	
+ADP (100 μM)	18567	58.7
+DNP (10 μM)	11643	74.1
+ADP+DNP	9568	78.7
DAB 1 M Mit	42796	95.1*
+ADP	19898	53.4
+DNP	12512	70.8
+ADP+DNP	10379	75.7
DAB 2 M Mit	41398	92*
+ADP	19708	52.4
+DNP	11388	72.5
+ADP+DNP	9433	77.2
DAB 3 M Mit	43935	97.6*
+ADP	20463	53.4
+DNP	12609	71.3
+ADP+DNP	9933	77.4
DAB 4 M Mit	36680	81.6*
+ADP	18303	50.1
+DNP	12178	65.8
+ADP+DNP	10678	70.9
DAB 5 M Mit	35138	78.1*
+ADP	17889	49.0
+DNP	13950	60.3
+ADP+DNP	11858	66.3
DAB Hepatoma	6310	14*
+ADP	3371	46.6
+DNP	2644	58.1
+ADP+DNP	2267	64.1

\*は正常ラット肝ミトコンドリアに対する%

表6 各種腹水癌細胞ミトコンドリアの Pi-ATP 交換反応

動物群及び処置群	<sup>32</sup> P カウント数 (c.p.m)	阻害率 (%)
Nor. Mit	45001	
+ADP (100 μM)	18567	58.7
+DNP (10 μM)	11643	74.1
+ADP+DNP	9568	78.7
AH 127 Mit	6354	14.1*
+ADP	5615	11.6
+DNP	3236	48.9
+ADP+DNP	1747	72.6
AH 130 Mit	6615	14.7*
+ADP	4729	28.4
+DNP	2333	64.8
+ADP+DNP	1886	71.4
AH 66 F Mit	4174	9.3*
+ADP	3312	20.7
+DNP	2408	42.3
+ADP+DNP	1801	56.9
吉田肉腫 Mit	1205	2.7*
+ADP	975	19.1
+DNP	785	34.9
+ADP+DNP	484	59.8

\*は正常ラット肝ミトコンドリアに対する%

即ち,  $^{32}\text{P}$ i のみでは, せいぜい 321 c.p.m の放射能指数であり, また standard medium に succinate 3 mM, あるいは ADP 100  $\mu\text{M}$  のみをミトコンドリアと共に加えても 800 c.p.m にも達しない。しかしながら, medium, ミトコンドリア, 基質, ADP

等がそろった条件では,  $^{32}\text{P}$ i の取り込みが一挙に約6倍に増大し, ミトコンドリアの量, ADP の量の増加に対応して取り込み率も増大することが分る。

#### 1. 正常ラット肝ミトコンドリア

表7  $^{32}\text{P}$ i の取り込みに関する基礎実験成績

実 験 群	$^{32}\text{P}$ カウント数 (c.p.m)
1) $^{32}\text{P}$ i (2 $\mu\text{C}/\text{ml}$ )	73
2) $^{32}\text{P}$ i (5 $\mu\text{C}/\text{ml}$ )	131
3) $^{32}\text{P}$ i (10 $\mu\text{C}/\text{ml}$ )	321
4) $^{32}\text{P}$ i (10 $\mu\text{C}/\text{ml}$ ) + Standard medium + Succinate (3 mM)	271
5) 4) + Mit (2 mg Protein)	641
6) $^{32}\text{P}$ i (10 $\mu\text{C}/\text{ml}$ ) + Medium + ADP (100 $\mu\text{M}$ ) + Mit (2 mg Protein)	786
7) 6) + Suc (3 mM)	4646
8) 6) + Suc (3 mM) + Mit (2 mg Protein)	7124
9) 6) + Suc (3 mM) + Mit (4 mg Protein)	7667
10) 6) + Suc (3 mM) + ADP (400 $\mu\text{M}$ ) + Mit (4 mg Protein)	9489

表8 正常ラット肝及び DAB 飼育各月, DAB 肝癌, 各ミトコンドリアの  $^{32}\text{P}$ i の取り込み

動物及び処置群	$^{32}\text{P}$ カウント数 (c.p.m)	阻害率 (%)
Nor. Mit	6987	
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	5570	20.3
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	1637	76.6
DAB 1 M Mit	6852	98.1*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	5401	21.5
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	1686	75.4
DAB 2 M Mit	5636	80.7*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	4870	13.6
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	1595	17.7
DAB 3 M Mit	6493	92.9*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	5530	14.8
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	1771	72.7
DAB 4 M Mit	6064	86.6*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	5451	10.3
+DNA (50 $\mu\text{M}$ )	1273	79.0
DAB 5 M Mit	4458	64.8*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	2171	51.3
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	896	79.9
DAB Hepatoma	887	12.7*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	382	56.9
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	86	90.2

\*は正常ラット肝ミトコンドリアに対する%

表9 各腫腹水癌細胞ミトコンドリアの  $^{32}\text{P}$ i の取り込み

動物及び処置群	$^{32}\text{P}$ カウント数 (c.p.m)	阻害率 (%)
Nor. Mit	6987	
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	5570	20.3
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	1637	76.6
AH 127 Mit	776	11.1*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	411	47
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	32	95.9
AH 130 Mit	961	13.8*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	304	68.4
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	67	93
AH 66 F Mit	733	10.5*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	261	64.4
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	146	80.1
吉田肉腫	310	4.4*
+DNP (10 $\mu\text{M}$ )	76	75.5
+DNP (50 $\mu\text{M}$ )	47	84.8

\*は正常ラット肝ミトコンドリアに対する%

非常に高い取り込みを示し、放射能指数は6987 c.p.m であるが、DNP 10 μM で20.3%、50 μM で76.6%阻害される(表8)。

2. DAB 飼育各月及び DAB 肝癌ミトコンドリア飼育の経過に応じて、次第に減少し、5カ月目では、正常の64.8%の取り込みを示す。DNP による阻害率はこれに対応して増加する傾向を示し、5カ月目では、10μMで51.3%、50 μM で79.9%となる。DAB 肝癌の取り込みは顕著に減少し正常に比べて12.7%となり、DNP 10 μM で 56.9%、50 μM で 90.2%の阻害率を示す(表8)。

3. 各種腹水癌ミトコンドリア

各腹水癌ともに、取り込みは正常の10%まで低下するが、DNP による阻害率は、10 μM で正常の約2~3倍となり、50 μM では 80~95%と増大する(表9)。

V. ATPase 活性

1. 正常ラット肝ミトコンドリア

理論的には、ミトコンドリアが無傷であると、潜在性 ATPase 活性は 0 に近いわけである<sup>34)</sup>が、我々の用いたミトコンドリアの26回の潜在性 ATPase 活性の平均値は、Pi として 498±13 mμ moles/ml であり、DNP (10 μM)-activated ATPase 活性<sup>35)</sup>は脱共軛のため増大し、2483±11 mμ moles/ml, Mg<sup>++</sup>

(6mM)-activated ATPase 活性<sup>36)</sup>は 413±19 mμ moles/ml, Ca<sup>++</sup>(10 mM)-activated ATPase <sup>37)</sup>活性は 1293±10 mμ moles/ml である(図10, 11の横線)。

2. DAB 飼育各月及び DAB 肝癌ミトコンドリア飼育1カ月目より5カ月目までは、大体正常と同じく潜在性 ATPase 活性は 480 mμ moles/ml 前後を示し、DNP-, Mg<sup>++</sup>-, Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性もほぼ同様の態度である。DAB 肝癌では、潜在性 ATPase 活性は 248 mμ moles/ml と正常の約1/2に低下し、DNP-activated ATPase 活性も非常に減少する。また Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 活性は、逆に増加し正常の約2倍を示す。Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性はやや正常より減弱する(図10)。

3. 各種腹水癌ミトコンドリア

全体として、潜在性 ATPase 活性は軽度増加し 500~1000 mμ moles/ml の間を示し、DNP-activated ATPase 活性は、正常の約1/2程度であり、Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 活性は、潜在性 ATPase 活性とほぼ同じ値をとる。Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性は、顕著でなく正常の約1/2の 600 mμ moles/ml 前後の値を示す(図11)。

IV. 電子顕微鏡的所見

DAB 飼育3カ月後の肝ミトコンドリアの電顕組織

図10 正常ラット肝ミトコンドリア(横線)と DAB 飼育後各月及び DAB 肝癌ミトコンドリア(棒グラフ)の各種 ATPase 活性

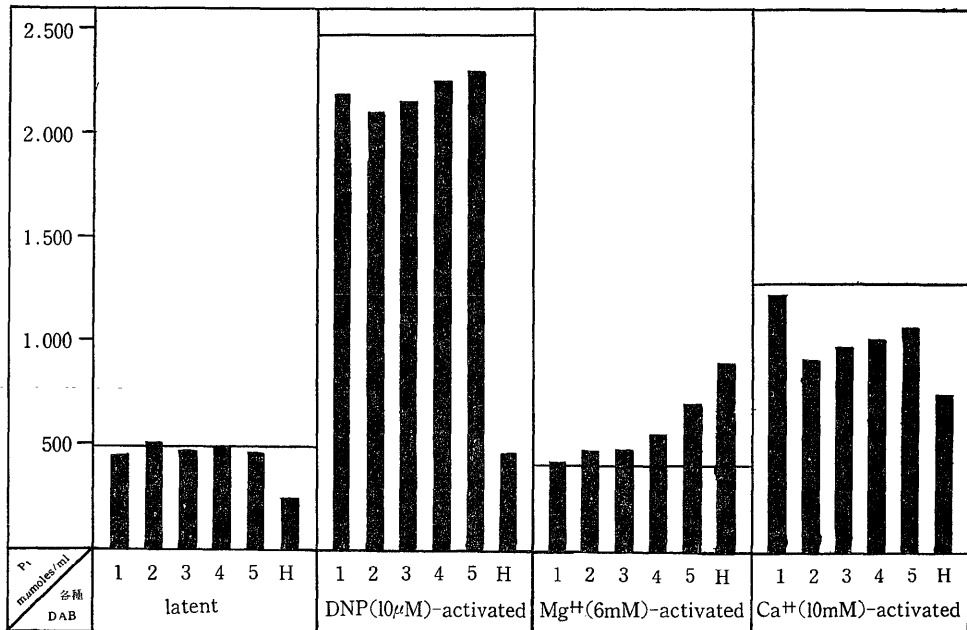
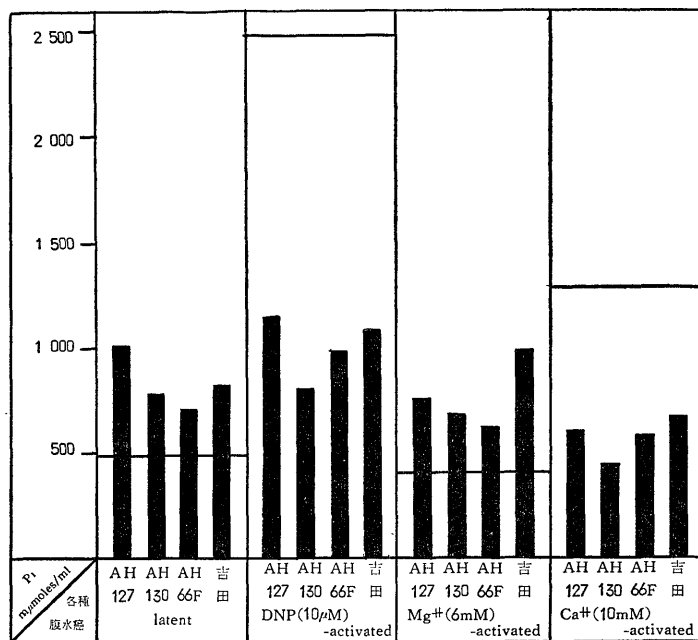


図11 正常ラット肝ミトコンドリア (横線) 及び各腹水癌細胞ミトコンドリア (棒グラフ) の各種 ATPase 活性



像は、正常肝ミトコンドリアと比較して著明な変化はみられない。DAB 肝癌ミトコンドリアでは、明らかな膨化、変形がみられ、その数も減少する傾向があり、*cristae* は漸次減少し辺縁に不整な配列をとる傾向が認められる (写真 1, 2, 3)。

分離した各種ミトコンドリアでは、正常、癌ともにその構造がよく保持されていることが確かめられた (写真 4, 5, 6, 7, 8, 9)。

### 考 察

癌細胞のエネルギー代謝は、Crabtree, Warburg 等によって見出された“酸素気中における癌組織の glucose 添加による  $Q_{O_2}^2/Q_{O_2}$  比の増大”という事実<sup>38)</sup>を中心に、解糖作用、呼吸作用及びその関連性について検討されている。しかしながら、癌細胞の解糖作用については異常な解糖能を示すことは事実であるとしても、その解糖機序に関しては、正常組織との間に質的相異は見い出されていない<sup>39)</sup>。

一方、呼吸作用についても、ミトコンドリアレベルで Racker<sup>40)</sup>, Chance<sup>41)</sup>ら多くの学者によって詳しく研究されているが、癌細胞の特異性を示す要因は確認されていない。即ち、Barban, Schulze<sup>42)</sup>らは HeLa 細胞について、電子伝達系に電子を供給する TCA サイクルの諸酵素に活性を認め、その作動の可能性は充分であることを見出した。電子伝達系に

関しては、Glock, McLean<sup>43)44)</sup>は NADP のレベルの低下を記載し、また Stotz<sup>45)~49)</sup>らによると cytochrome C oxidase 活性の低下を認めているが、Keilley<sup>50)</sup>は、皮膚癌では cytochrome C oxidase 活性の低下は認められないと報告している。更に、Chance 及び Hess<sup>51)52)</sup>によると、Ehrlich 腹水癌 (6日目)では、電子伝達系のあらゆる酵素系が存在することを認め、その相対量にも異常を見い出していない。そしてこの癌細胞ミトコンドリアの酸化的リン酸化は、succinate を基質とした場合  $P/O=1.8$  と測定され、ほとんど理論値に近いとしている。しかし HeLa 細胞での小林の実験では  $P/O$  比の低下が認められている<sup>15)</sup>。またこれら呼吸機能と生理的に同期する膨化収縮能は、一様に低下すると報告されているが、なお不明の点が多い。

解糖と呼吸との関連性についてであるが Warburg らによって強調された Crabtree 効果<sup>38)</sup>は、その後 Chance<sup>51)52)</sup>, Racker<sup>53)</sup>らによって、 $P_i$ , ADP の競争的要求, ATP の区画性などから説明されているが、最近の Morris の“minimum deviation tumor”ではこの唯一の特異性と考えられる Crabtree 効果も認められていない<sup>6)</sup>。

このような研究結果を総合すると、癌の種類、その分化の時期、発生母地などによって酵素活性の変動が著しく、いわゆる癌としての特異性は認められない

が、細胞内の代謝調節機構の乱れと考えられる点が多く、この意味でミトコンドリアの性格についての考察が必要であると考えられる。

DAB 色素で飼育したラット肝ミトコンドリアについて経時的に観察すると、1カ月目より5カ月目までは、電子顕微鏡的にも著変はなく、呼吸様式についても正常との間に質的相異は認められない。しかし飼育日数と併行して state 4 呼吸の増大、ADP/O 比の低下、呼吸調節率の低下が認められ、特に肝硬変期に相当する5カ月目のミトコンドリアでは、ADP/O 比の著しい低下が観察される。癌化した DAB 肝癌のミトコンドリアでは、state 4 呼吸の一層の増大、呼吸調節率の低下が著明で、ADP による state 3 呼吸及び DNP に対する感受性が失なわれる。各種腹水癌ミトコンドリアでは、ほぼ DAB 肝癌のそれと類似するが、ADP による state 3 呼吸の増進が特異的であって、state 4 呼吸への転移は認められない。しかし僅かではあるが DNP に対する感受性が確認されることは、酸化的リン酸化が高度に障害されているが、消失の可能性は少ないと考えられる。 $\beta$ -Hydroxybutyrate を基質として用いた場合は、AH66F を1例にあげると、succinate 基質に比べ、むしろ state 4 呼吸が減少するが、その他の点では、呼吸調節率の低下等ほぼ succinate を基質とした場合と同様の結果である。

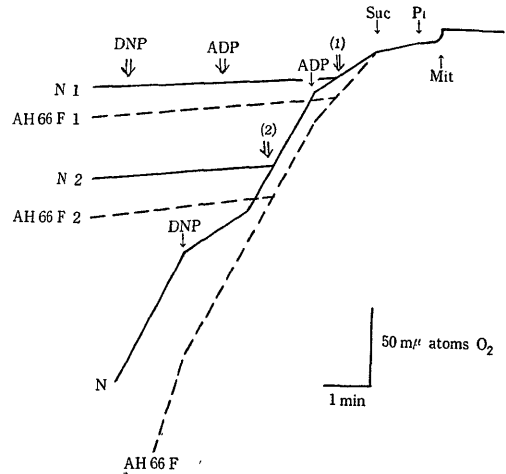
以上癌細胞における呼吸機能の特徴は、電子伝達能の異常を示す state 4 呼吸の増大、呼吸調節率の低下、酸化的リン酸化系の障害による ADP/O 比の低下あるいは消失、等である。

まず、電子伝達系に介在する諸酵素の活性について考察する。

NADH dehydrogenase, succinic dehydrogenase, NADH cyt. C reductase, succinate cyt. C reductase, NADH oxidase, cyt. C oxidase 等の諸酵素の活性を調べると、DAB 色素で飼育したラット肝ミトコンドリアでは、飼育月数の経過に応じて段階的に低下する。DAB 肝癌及び各種腹水癌では、これら酵素活性は更に著明な低下を示す。しかしながら、コハク酸脱水素酵素阻害剤で succinate と (fs-Fe) 間の電子伝達を阻害するロマン酸, cyt. b-cyt.  $c_1$  間を阻止するアンチマイシン A, cyt. oxidase を阻害する  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaN}_3$  を作用させて酸素消費曲線を描くと、癌においても、正常ミトコンドリアと同様の阻害態度がみられる (図12)。

このことは、癌ミトコンドリアの電子伝達系の健全を示すものであるが、他方、これら酵素活性の異常な

図12 電子伝達阻害剤アンチマイシン A ( $10^{-7}\text{M}$ ) の正常ラット肝 (N) 及び AH66F ミトコンドリアの酸素消費曲線に対する作用



AH66F 1 } state 4 の ↓(1) の場所にアンチマイシン A  $10^{-7}\text{M}$  作用させた場合  
N 1 }

AH66F 2 } state 3 の ↓(2) の場所にアンチマイシン A  $10^{-7}\text{M}$  作用させた場合  
N 2 }

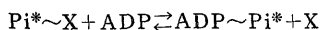
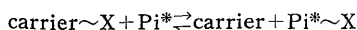
低下にも拘わらず state 4 呼吸の酸素消費が増大することは説明困難ではあるが、その能力は完全には失なわれず、また酸素消費の増大は、他の実験結果をも考慮して膜障害によって基質と電子伝達系諸酵素との接触が容易になったためであろうと考えられる。なお、各種癌の state 4 呼吸の増大の程度と電子授受の第一の酵素群である NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase 及び最終酵素である cyt. C oxidase 活性の低下の程度の間には若干の関連性が認められることは興味深い (図8-d, e, 9 参照)。

つぎに酸化的リン酸化系であるが、ADP による呼吸調節能の低下あるいは消失から考えて、強い障害のあることが推察される。同じ材料について、 $^{32}\text{P}_i$  の取り込み実験を検討すると、DAB 色素飼育ラットでは、肝硬変期の5カ月目ではじめて取り込み量が減少し、DAB 肝癌では正常の約1/8に減少する。腹水肝癌でも、ほぼ同様であるが、吉田肉腫では正常の約1/20まで減少し、酸化的リン酸化の著明な障害を示している。

つぎに酸化的リン酸化系の  $\text{P}_i$ -ATP 交換反応について検討しよう。この反応は、DNP によって阻害される事実より、酸化的リン酸化系に非常に密接に関連し<sup>54)</sup>、Lipmann の flow sheet theory に則して考えると酸化的リン酸化系の終末の転移リン酸化反応を反映するものである<sup>55)</sup>。従って ATPase 活性と共

に考慮されねばならない。

Pi-ATP 交換反応に関与する反応系<sup>54)</sup>は、



と考えられ、ADP と Pi 及び ATP の濃度により強く影響される<sup>56)</sup>。我々の行なった交換反応は2分という短時間の incubation 後のものであって、この反応の結果は、ATPase 活性による ATP の消失に関係なく、真の交換反応を表現していると考えられる。しかし、正常ミトコンドリアについての実験結果では、ADP の添加によってほぼ 60%、DNP の添加により 74.1% の阻害がみられることから、ATPase 活性の関与もある程度考慮する必要がある。

DAB 色素で飼育したラット肝ミトコンドリアでは4カ月目より Pi-ATP 交換反応は低下し、ADP、DNP による阻害効果も低下してくる。DAB 肝癌では、交換反応の低下が更に著明で正常の約 1/7 以下となる。腹水肝癌でも、ほぼ同様に低下するが、吉田肉腫に関しては特に著しく、正常の約 1/28 となる。ADP、DNP による阻害効果も小さく、この傾向は特に吉田肉腫で著明である。

Pi-ATP 交換反応の全体の系における評価は、必ずしも一定でないが、リン酸化系の site 1, 2 に関係し、この反応の低下は DNP 添加や膜損傷による酸化的リン酸化能の低下と併行していると考えられている。しかしながら、癌化と共に Pi-ATP 交換反応が低下するが、DNP による阻害効果も減弱するという事実は、単なる膜の障害のみでは説明困難であり、酸化的リン酸化に関与しない Pi-ATP 交換反応の存在を暗示する多くの実験結果と一致する<sup>57)</sup>。

つぎに ATPase 活性についてみると、潜在性 ATPase 活性は、DAB 色素飼育のラット肝及び各種腹水癌ミトコンドリアで、ほぼ正常範囲を示していることから、ミトコンドリア分離に際しての人工的膜損傷は否定されてよい。

DNP-activated ATPase 活性<sup>55)</sup>は、DAB 飼育 1~5 カ月までは軽度ではあるが低下し、癌化した組織からのミトコンドリアでは、更に著しく低下し、coupling factor の障害を示す。各種腹水癌でも、ほぼ同様の結果である。

Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 活性<sup>58)59)</sup>は、DAB 飼育 2 カ月目より僅かではあるが、月数の経過と一致して増加する。膜障害に関係あると考えられる Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 活性が癌化と共に上昇することは注目されてよく、能動透過に関連するとされる Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性<sup>37)</sup>も既に飼育 2 カ月目

より低下していることと考え併せ興味がある。各種腹水癌では、種により多少の相異が認められ、特に Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性が DAB 肝癌に比して低下していることは、その生活環境を考慮して検討すべきものと考えられる。

このように、膜障りによる ATPase、能動透過による ATPase 等の活性が、癌化に先行して変化することは、膜性質の異常、特に能動透過、イオン蓄積等の障害が癌細胞の代謝調節機構の乱れと密接に関連していることを示すものであろう。共同研究者久藤<sup>1)</sup>も、各ミトコンドリア膜の電気的性質の解析より、癌ミトコンドリア膜の膜構築及びイオン透過性の異常を指摘している。

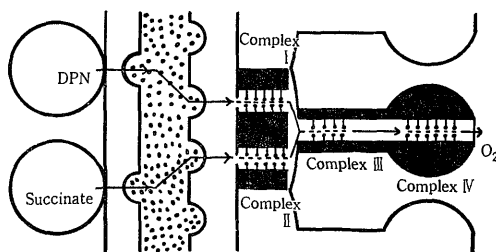
膜性質に由来する膨化収縮能は、DAB 飼育による発癌過程及び DAB 肝癌、各種腹水癌細胞のミトコンドリアで、一様に低下するが、このことは Arcos<sup>60)~62)</sup>らによって報告されている。ミトコンドリアの膨化収縮は、電子伝達系、酸化的リン酸化系と同期<sup>63)64)</sup>し、能動透過とも密接に関連している<sup>65)</sup>。この機構として大西<sup>66)</sup>は収縮性蛋白を想定し、就中リン脂質の性質を重要視<sup>67)68)</sup>している。

我々の得た癌化の過程及び各種癌ミトコンドリアの膨化収縮能の低下という結果は、電子伝達系や酸化的リン酸化系の特異的な機能低下（これらの諸酵素は内膜に局在する）と併せ考えて、内膜の障害特にリン脂質の異常を示指する。

ところで、ミトコンドリアは機能的に一定の代謝型を示すと同時に、その微細構造ともよく対応することが知られている。

図13は Green, Oda によって呈示された模式図である<sup>69)</sup>が、ミトコンドリアは膜成分に富み、これらをもととして電子伝達系及び酸化的リン酸化系酵素が秩

図13 電子伝達粒子内の四つのエネルギー産生複合体の仮想的配置模型図 (Green, Oda による)



黒色の部分はタン質、無地の部分はリン脂質、タンパク質からリン脂質内に突出している留め針様のものは官能基を示す。打点の部分は構造内空間である。

表10 正常ラット肝, DAB 肝癌及び各種腹水癌細胞ミトコンドリアのリン脂質分画

分 画	正常肝 (%)	DAB 1M	DAB 4M	DAB 5M	DAB 肝癌	AH 127	AH 130	AH 66F	吉田肉腫
Lysophosphatidyl choline	0.4	0.6	0.4	0.3	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3
Sphingomyelin	0.8	0.8	0.8	1.8	2.3	6.6	7.3	2.5	3.1
Phosphatidyl choline	48.2	48.2	48.7	49.6	52.4	48.9	50.2	53.7	51.9
Phosphatidyl serin	8.6	8.9	8.9	7.1	8.6	9.7	6.4	7.1	8.3
Peohsphatidyl ethanolamine	42.0	41.8	41.3	41.6	36.4	34.3	36.4	36.3	36.5

序正しく配列している。膜の構成々分の90%はリン脂質よりなり、また脂質中には CoQ のように電子伝達に重要な脂溶性物質が含まれている<sup>70)</sup>。ミトコンドリアの機能とリン脂質の関連性については、Green<sup>71)~73)</sup>一派の多くの研究があるが、ミトコンドリアからリン脂質を抽出すると酸化的リン酸化能は勿論、すべての総合的酵素活性が消失し、リン脂質の添加によってこれらの酵素の総合的あるいは部分的活性を回復することができるという報告<sup>74)75)</sup>も見い出される。

このようにミトコンドリアにおける脂質は基本粒子と構造蛋白の連結に必要であるばかりでなく、基本粒子の各成分の分節間の橋渡しとしても重要な役割を果たしている<sup>76)</sup>と考えられる。従ってリン脂質組成についての検討は、第一に膜成分として物質の輸送への関与、第二に酵素活性への寄与に関連して意義がある。

同人高沢<sup>12)</sup>は、同じ各種癌ミトコンドリアを材料として、Wagner<sup>77)</sup>の変法によってリン脂質成分を検討しているが、表10に示す如く癌化に応じてスフィンゴミエリンの増加とエタノールアミンの減少を認めている。また同人法幸<sup>8)</sup>、素谷<sup>9)</sup>は、ミトコンドリアのDOC可溶性リポ蛋白分画に癌特異抗原を見い出している。

以上、多くの実験事実は、癌ミトコンドリアにおける電子伝達系及び酸化的リン酸化系などの機能障害を示すが、これらに関係する諸酵素は膜に局在することや、癌化に先行してまず膜の障害が認められることなどを考え合せると、その背景には膜とくにリン脂質成分の異常を暗示する。

## 結 論

ラットの DAB 色素飼育による発癌過程、及び DAB 肝癌ミトコンドリア、更に系を同じくする各種腹水肝癌 (AH127, AH130, AH66F)、および吉田肉腫腹水癌のミトコンドリアのエネルギー代謝について、主に電子伝達系とこれに共役したリン酸化系を中心として、それに付随する膜の性質について検討した。

1. DAB 色素での飼育経過に応じて、state 4 の酸素消費量の増大、ADP/O 比の低下、及び呼吸調節率の低下が認められ、DAB 肝癌ではこの傾向が一層顕著となり、ADP/O 比の消失を認めた。各種腹水癌でも同様に、state 4 の酸素消費量の増大、ADP/O 比の消失、呼吸調節率の低下を認めた。

2. 電子伝達系に介在する諸酵素の活性は、DAB 色素飼育によるものでは、その発癌過程から肝癌発生に至るまで、諸酵素活性の段階的低下が認められた。DAB 肝癌及び各種腹水癌では、各酵素活性の著明な低下を認め、また各種腹水癌に関しては、state 4 の酸素消費量の増大と酵素活性の低下の間に相関々係が認められた。

3. <sup>32</sup>Pi の取り込みは、DAB 飼育 4 カ月目までは正常と大差ないが、肝硬変期の 5 カ月目より減少し、DAB 肝癌では正常の約13%にすぎなかった。各腹水癌でも、取り込みは著明に減弱し、とくに系の異なる吉田肉腫では正常の約4%に低下した。DNP による阻害効果は正常に比べて一層著明であった。

4. Pi-ATP 交換反応は、DAB 飼育 4 カ月目より次第に低下し、ADP, DNP による阻害効果も減弱してくるが、DAB 肝癌では交換反応の低下が更に顕著であった。各種腹水癌では DAB 肝癌と同じく正常の約10%前後に低下し、吉田肉腫では最も低下が著しく正常の約3%を示した。

5. ATPase 活性に関しては、DAB 飼育によるものでは、5 カ月目まで、DNP-activated ATPase 活性の低下、膜障害に関係する Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 活性の段階的亢進、能動透過に関与する Ca<sup>++</sup>-activated ATPase 活性の低下が認められ、DAB 肝癌では、この傾向が一層顕著となった。各腹水癌では、大体 DAB 肝癌と同様の結果であった。

6. 膜性質に由来する膨化収縮能は DAB 飼育の経過に応じて次第に低下し、DAB 肝癌では、この減弱が更に著明であり、各腹水癌でも、膨化収縮能の異常な低下を認めた。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授並びに恩師水上哲次教授に深く感謝いたします。また親切なる御指導御教示をいただきました小田島康夫助教授に厚く感謝いたします。さらに有益なる御助言並びに御協力いただきました福田静雄助手、高沢ますみ助手及び生物々理グループの諸氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Crabtree, H. G. : *Biochem. J.*, **23**, 536 (1929).
- 2) Warburg, O. : *Science*, **124**, 209 (1956).
- 3) Warburg, O. : *Naturwissenschaften*, **42**, 401 (1955).
- 4) Warburg, O. : *Science*, **123**, 309 (1956).
- 5) Warburg, O. : *Science*, **124**, 269 (1956).
- 6) 杉村 隆 : 蛋・核・酵, **9**, 1110 (1964).
- 7) 石川大刀雄 : 第25回日本癌学会総会, 1966.
- 8) 法幸多良雄 : 十全医会誌, **74**, 30 (1966).
- 9) 素谷 宏 : 十全医会誌, **75**, 223 (1997).
- 10) 石川大刀雄 : 実験形態学誌, **17**, 8 (1963).
- 11) 久藤豊治 : 十全医会誌, 投稿中.
- 12) 高沢ますみ : 私信による.
- 13) 原田三樹男・水谷太郎・九谷八郎 : 大阪医誌, **36**, 738 (1937).
- 14) Utsumi, K. : *Acta Med. Okayama*, **17**, 259 (1963).
- 15) 小林茂保・萩原文二 : 酵素化学シンポジウム, **17**, 67 (1962).
- 16) Scholefield, P. G., Sato, S. & Weinhouse, S. : *Cancer Res.*, **20**, 661 (1960).
- 17) Utsumi, K., Yamamoto, G. & Inaba, K. : *Biochem. Biophys. Acta*, **105**, 368 (1965).
- 18) Packer, L. : *J. Cell Biol.*, **18**, 487 (1963).
- 19) 清水蔵一 : 十全医会誌, **75**, 327 (1967).
- 20) Chance, B. & Williams, G. R. : *J. Biol. Chem.*, **217**, 383 (1955).
- 21) Hagihara, B. : *Biochem. Biophys. Acta*, **46**, 134 (1961).
- 22) Davis, J. S. & Bollet, A. J. : *J. Clin. Invest.*, **41**, 2142 (1962).
- 23) 奥賀一男 : 酵素研究法(赤堀編)第2巻, 349頁, 東京, 朝倉書店, 1965.
- 24) Chen, L. H. & Dallan, R. D. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 104 (1965).
- 25) Hagihara, B. & Lardy, H. A. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 889 (1960).
- 26) King, E. J. : *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
- 27) Palade, G. E. : *J. Exptl. Med.*, **95**, 285 (1952).
- 28) Luft, J. H. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409 (1961).
- 29) Chance, B. & Williams, G. R. : *Adv. Enzymology*, **17**, 65 (1956).
- 30) 萩原文二 : 蛋・核・酵, **12**, 1689 (1965).
- 31) 内海耕健・山本剛禎・浦上博之・西風桂子 : 岡山医会誌, **76**, 193 (1964).
- 32) Packer, L. : *J. Cell Biol.*, **18**, 495 (1963).
- 33) Packer, L. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 242 (1960).
- 34) Kielley, W. W. & Kielley, R. K. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 485 (1951).
- 35) Lardy, H. A. & Wellman, H. : *J. Biol. Chem.*, **201**, 357 (1953).
- 36) Potter, V. R., Siekevitz, P. & Simonson, H. C. : *J. Biol. Chem.*, **205**, 893 (1953).
- 37) Lardy, H. A., Johnson, D. & McMurray, W. C. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 587 (1958).
- 38) Warburg, O., Posener, K. & Negelein, E. : *Biochem. Z.*, **152**, 309 (1924).
- 39) LePage, G. A. : *Cancer Res.*, **8**, 193 (1948).
- 40) Wu, R. & Racker, E. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1029 (1959).
- 41) Chance, B. & Hess, B. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 2421 (1959).
- 42) Barban, S. & Schulze, H. E. : *J. Biol. Chem.*, **222**, 665 (1956).
- 43) Glock, G. E. & McLean, P. : *Biochem. J.*, **61**, 388 (1955).
- 44) Glock, G. E. & McLean, P. : *Biochim. J.*, **65**, 413 (1957).
- 45) Stotz, E. : *J. Biol. Chem.*, **131**, 555 (1939).
- 46) Schneider, W. C. & Potter, V. R. : *Cancer Res.*, **3**, 353 (1943).
- 47) Shack, J. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **3**, 389 (1943).
- 48) Rosenthal, O. & Drabkin, D. L. : *J. Biol. Chem.*, **150**, 131 (1943).
- 49) Greenstein, J. P., Werne, J., Eschenbrenner, A. P. & Leuthardt, F. M. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **5**, 55 (1944).
- 50) Kielley, R. K. : *Cancer Res.*, **12**, 124 (1950).
- 51) Chance, B. & Hess, B. : *Science*, **129**, 700 (1959).
- 52) Chance, B. & Hess, B. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 2404 (1959).
- 53) Racker, E. & Wu, R. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1036 (1959).
- 54) Boyer, P. D., Falcone, A. B. & Harrison, W. H. : *Nature*, **174**, 401 (1954).
- 55) Cooper, C. & Lehninger, A. L. : *J. Biol. Chem.*, **224**, 561 (1957).
- 56) Wadkins, C. L. & Lehninger, A. L. : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1589 (1958).
- 57) Weinbach, E. C. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1580 (1959).
- 58)



- Kielley, W. W. & Kielley, R. K. : J. Biol. Chem., 200, 213 (1953). 59) Tanaka, R. & Abood, L. G. : J. Biol. Chem., 237, 2999 (1962). 60) Arcos, J. C. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 49 (1960). 61) Arcos, J. C. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 23 (1961). 62) Emmelot, P. : Exptl. Cell Res., 24, 280 (1961). 63) Packer, L. : J. Biol. Chem., 235, 242 (1960). 64) Packer, L. : J. Biol. Chem., 235, 525 (1960). 65) 内海耕髓・山本剛禧・稲葉耕三・大原幸子・山本道夫 : 細胞化学シンポジウム, 13, 113 (1963). 66) 大西 颯 : 蛋・核・酵, 10, 1685 (1965). 67) Richardson, T., Tappel, A. L., Smith, L. M. & Houle, C. R. : J. Lipid Res., 3, 244 (1962). 68) Richardson, T. & Tappel, A. L. : J. Cell Biol., 13, 43 (1962). 69) 小田琢三 : 新細胞学 (妹尾, 高本編) 第1版, 106頁, 東京, 朝倉書店, 1964. 70) Crane, F. L., Hatfeji, Y., Lester, R. L. & Widmer, C. : Biochem. Biophys. Acta, 25, 220 (1957). 71) Green, D. E. : 蛋・核・酵, 7, 174 (1962). 72) Sekuzu, I., Jurtshuk, P. & Green, D. E. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 71 (1961). 73) Green, D. E. & Fleischer, S. : Biochim. Biophys. Acta, 70, 554 (1963). 74) Lester, R. L. & Fleischer, S. : Biochim. Biophys. Acta, 47, 358 (1961). 75) Brierley, G. P., Merola, A. J. & Fleischer, S. : Biochim. Biophys. Acta, 64, 218 (1962). 76) Lehninger, A. L. : The Mitochondrion, New York, Benjamin, Inc., 1964. 77) Wagner, H. : Fette, Seifen, Anstrichmittel, 63, 1119 (1961).

## Abstract

The energy metabolism of cancer was studied, using rats mainly from the aspect of respiratory chain and oxidative phosphorylation of mitochondria in tumor cells of DAB-induced hepatoma, cells in the process of DAB carcinogenesis, ascitic tumor cells of the identical origin such as ascitic hepatoma AH 127, AH 130, and AH 66F, and Yoshida sarcoma.

1) Depending on the development of the carcinogenetic process of DAB hepatoma, an increase in oxygen consumption was observed in the state 4, whereas ADP/O ratio and respiratory control index were decreased.

In addition, it was found that respiratory control of ADP disappeared in DAB hepatoma and various ascitic tumor cells.

2) The activities of mitochondrial enzymes, particularly in the electron transport system, declined also stepwise in the carcinogenetic process of DAB hepatoma. Decline of the activities of mitochondrial enzymes in ascitic tumor cells was almost as large as that in established DAB hepatoma.

There was a close correlation between the decrease in enzymatic activities and the increase in oxygen consumption in state 4.

3) There was little difference in Pi incorporation and Pi-ATP exchange reaction between mitochondrial membrane in carcinogenetic process and normal control until 4th month of DAB feeding, which were gradually decreased thereafter approximately to 10 per cent and 3 per cent of the normal mitochondria respectively in DAB hepatoma and Yoshida sarcoma.

4) As to the ATPase activity of the mitochondrial membrane, the activities of DNP-activated and Ca<sup>2+</sup>-activated ATPase, the latter participating in the active transport, were decreased in the DAB hepatoma and various ascitic tumor cells. Mg<sup>2+</sup>-activated ATPase activity was increased, which is said, to be related to functional disturbance of mitochondrial membrane.

5) Stepwise decrease in physiological change in swelling-shrinkage of mitochondria was closely correlated with changes in the rate of substrate utilization

and respiratory control in DAB carcinogenetic process.

Swelling-shrinkage of mitochondria was markedly decreased in DAB hepatoma and the decrease was a little slighter in various ascitic tumor cells than in DAB hepatoma, the above-mentioned correlation being also similarly observed in both established tumor cells.

---

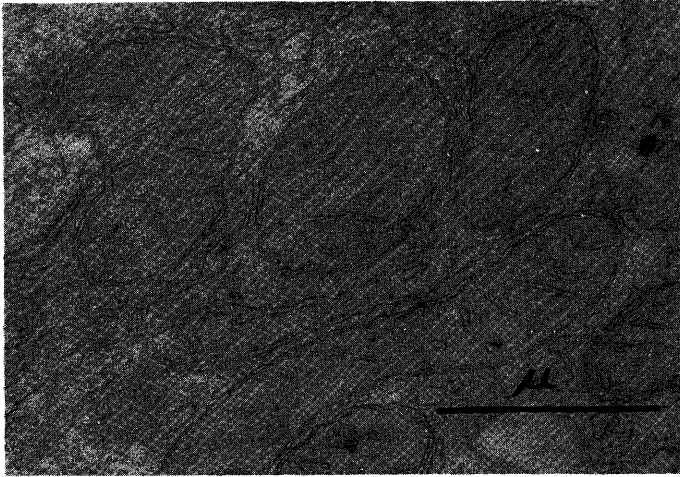


写真 1  
正常ラット肝組織電顕像  
(×30,000)

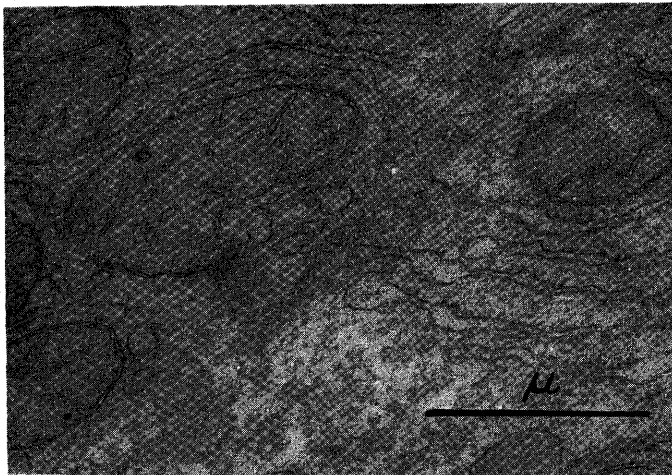


写真 2  
DAB 飼育3カ月ラット肝組  
織電顕像  
(×30,000)

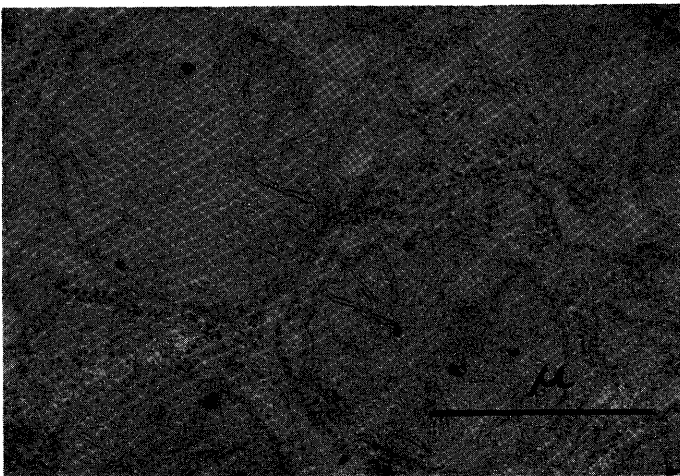


写真 3  
DAB ラット肝癌組織  
電顕像  
(×30,000)

写真4 正常ラット肝ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

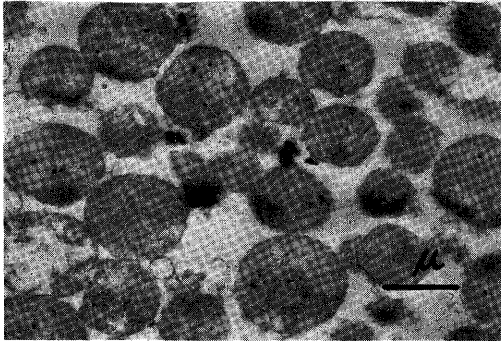


写真5 DAB 肝癌ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

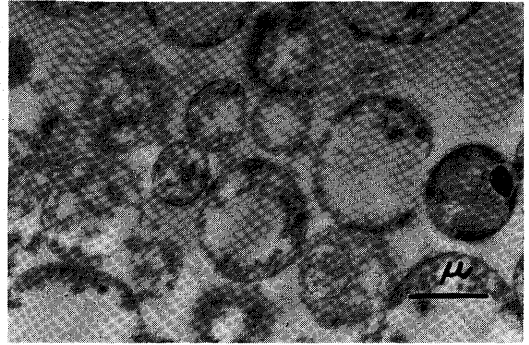


写真6 AH127 ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

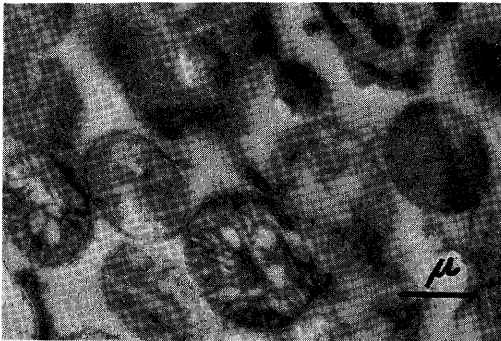


写真7 AH130 ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

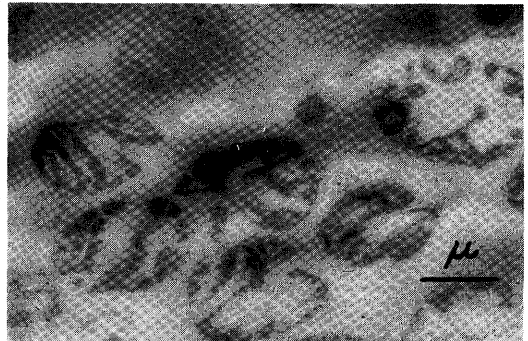


写真8 AH66F ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

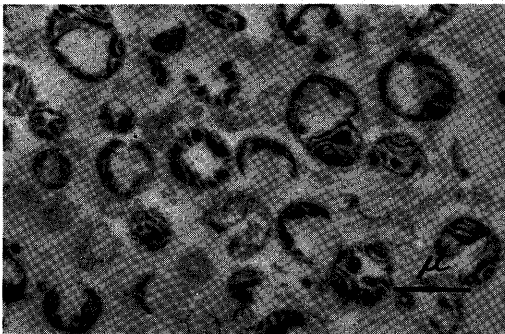


写真9 吉田肉腫ミトコンドリア分面  
電顕像 ( $\times 10,000$ )

